

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
FÜSIOLOOGIA OSAKOND

Ants Tamme

***EGF* geeni ekspressioon amfetamiini manustamisel indutseeritud psühhoosi mudelis**

Magistritöö (30 EAP)

Geenitehnoloogia

Juhendajad PhD Jürgen Innos

MSc Taavi Vanaveski

MSc Jane Narvik

Kaasjuhendaja PhD Tiina Tamm

TARTU 2016

***Egf* geeni ekspressioon amfetamiini manustamisel indutseeritud psühhoosi mudelis**

ErbB retseptortürosiinkinaasidega seonduvad EGF perekonna ligandid mõjutavad aju arengut ja toimimist. Kõrvalekaldeid ErbB ja EGF ekspressioonis on seostatud neuropsühhiaatriliste häiretega. Seoseid on leitud EGF ekspressioonitaseme ja esimese psühhoosi episoodi vahel. Psühhoos on üks skisofreeniale eelnev staadium, mille varajane diagnoosimine ning ravi võivad leevendada haiguse edasist kulgu. Käesolevas töös mudeldati psühhoosi amfetamiini kroonilisel manustamisel kahes käitumuslikult erinevas hiireliinis (BL6 ja SV129) ning mõõdeti *Egf* geeni ekspressioonitasemete muutusi frontaalkoores. Tulemuste põhjal saab oletada, et EGF on pigem esmase psühhoosi varane marker, mille ekspressioonitase võib hiljem langeda. Sellele viitavad katse tulemused, millest on näha, et EGFi tase tõusis ainult akuutsel manustamisel ja ainult amfetamiini suhtes tundlikus hiireliinis (BL6).

Märksõnad: skisofreenia, EGF perekond, ErbB retseptorid, psühhoosi mudeldamine, geeniekspressioon.

CERCS: B470 Füsioloogia

***Egf* gene expression in the model of amphetamine induced psychosis**

EGF ligands that interact with ErbB receptor tyrosine kinases influence brain development and function. Abnormalities in ErbB and EGF expression have been associated with neuropsychiatric disorders. Associations between EGF expression and first-episode psychosis (FEP) have been detected. Psychosis is one of the pre-stages of schizophrenia. Early diagnosis and treatment of psychosis may alleviate the further course of the disease. In this work chronic administration of amphetamine was used to evoke psychosis in two behaviorally different strains of mice (BL6 and SV129) and *Egf* gene expression alterations in the frontal cortex were measured. According to the results, EGF may be a marker of the early stage of FEP as the expression level of EGF increased only after acute treatment and only in amphetamine-sensitive mouse line (BL6).

Keywords: schizophrenia, EGF family, ErbB receptors, modeling psychosis, gene expression.

CERCS: B470 Physiology

SISUKORD

SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. EGF ja skisofreenia	6
1.1.1. Skisofreenia	6
1.1.2. EGF perekond	8
1.1.2.1. EGF ligandid	8
1.1.2.2. ErbB (EGF) retseptorid	12
1.1.2.3. <i>EGF</i> geeni roll esmase psühhoosi kujunemisel	15
1.2. Psühhoosi mudeldamine	17
1.2.1. Skisofreenia loomudelid	17
1.2.2. Amfetamiini manustamisega indutseeritud psühhoos	18
2. EKSPERIMENTAALOSA	20
2.1. Töö eesmärgid	20
2.2. Materjal ja metoodika	21
2.2.1. Katseloomad	21
2.2.2. Liikumisaktiivsuse katse	22
2.2.3. RNA eraldamine ja DNAasi töötlus	22
2.2.4. cDNA süntees	23
2.2.5. Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qPCR)	23
2.2.6. Andmete statistiline analüüs	24
2.3. Tulemused	25
2.3.1. Liikumisaktiivsuse katse	25
2.3.2. <i>Egf</i> geeni ekspressioonitaseme muutus	29
2.4. Arutelu	31
KOKKUVÕTE	33
RESÜMEE	34
KIRJANDUSE LOETELU	35
LIHTLITSENTS	45

KASUTATUD LÜHENDID

AR – amfireguliin (ingl *amphiregulin*)

BL6 – hiireliin C57bl6/N/tu

BTC – beetatselluliin (ingl *betacellulin*)

D2 – dopamiini retseptor 2

DOPAC – 3,4-dihüdroksüfenüüläädikhape (ingl *3,4-Dihydroxyphenylacetic acid*)

EGF – epidermaalne kasvufaktor (ingl *epidermal growth factor*)

Egf – hiire epidermaalist kasvufaktorit kodeeriv geen

EGFR – epidermaalse kasvufaktori retseptor

EPG – epigeen (ingl *epigen*)

EPR – epireguliin (ingl *epiregulin*)

ErbB – *erbB* geenilt ekspresseeritav retseptortürosiinkinaasi valk

erbB – lindude erütroblastoosi onkogeen B homoloog (ingl *avian erythroblastosis oncogene B*)

FEP – esimene psühhoosi episood (ingl *first-episode psychosis*)

GABA – gamma-aminovõihape (ingl *gamma-aminobutyric acid*)

HB-EGF – hepariinseoseline EGF-laadne kasvufaktor (ingl *heparin-binding EGF-like growth factor*)

KNS – kesknärvisüsteem

MDMA – 3,4-metüleendioksümetamfetamiin (ingl *3,4-Methylenedioxymethamphetamine*)

nAcc – naalduv tuum (ingl *nucleus accumbens*)

NMDA – N-metüül-D-aspartaat

NMDAR – N-metüül-D-aspartaadi retseptor

NRG – inimese neureguliini kodeeriv geen

NRG – neureguliin (ingl *neuregulin*)

PET – positronemissioontomograafia

PFC – prefrontaalkoor (ingl *prefrontal cortex*)

PPI – eelsignaliga ehmatuse pärssimise katse (ingl *prepulse inhibition of startle*)

qPCR – kvantitatiivne PCR

SV129 – hiireliin 29S6SVEV/tu

TGF α – transformeeriv kasvufaktor alfa (ingl *transforming growth factor alpha*)

TH – türosiini hüdroksülaas (ingl *tyrosine hydroxylase*)

SISSEJUHATUS

Inimese kesknärvisüsteem kujuneb lõplikult välja kolmandal aastakümnel. Närvisüsteemi arengus on viimane etapp frontaalkoore kujunemine. Frontaalkoor täidab keskset rolli intelligentsuse ja kognitiivsete võimete ning käitumise kontrollis. Frontaalkoore häirevaba toimimise tagab närvirakkude korrapärane areng ja signaaliülekanne.

Ühed aju arengut ja toimimist mõjutavad faktorid on lindude erütroblastoosi onkogeen B homologse geeni produktidega (ErbB), retseptortürosiinkinaasidega, seonduvad epidermaalse kasvufaktori (EGF) perekonna ligandid. EGF perekonna peptiide on laialdaselt uuritud seoses keskaju dopaminergiliste närvirakkude arengu ja elulemusega (Futamura jt, 2002). Samuti on leitud seoseid EGF ekspressioonitaseme ja esimese psühhoosi episoodi vahel (Haring jt, 2015). Skisofreenia on inimpopulatsioonis laialt levinud psühhiaatriline haigus ning psühhoos on üks sellele eelnevaid staadiume. Psühhoosi esimese episoodi diagnostika ning võimalikult varajane ravi alustamine võivad leevendada haiguse kulgu. Samuti loob see paremad võimalused järgmiste markerite leidmiseks.

Käesoleva magistritöö eesmärk oli psühhoosi mudeldamine amfetamiini kroonilisel manustamisel kahes käitumuslikult erinevas hiireliinis (BL6 ja SV129) ning *Egf* geeni ekspressioonitasemete tuvastamine frontaalkoores. Psühhoosi mudeli kontrollimiseks mõõdeti hiirte liikumisaktiivsust mõlema mudeli kolmes katsegrupis (kontroll, akuutne amfetamiini manustamine, krooniline amfetamiini manustamine) ning seejärel määrati qPCR meetodi vahendusel *Egf* geeni ekspressioonitaseme muutus katseloomade frontaalkoores.

Magistritöö on koostatud Tartu Ülikooli Meditsiiniteaduste valdkonna Bio- ja siirdemeditiini instituudi füsioloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. EGF ja skisofreenia

1.1.1. Skisofreenia

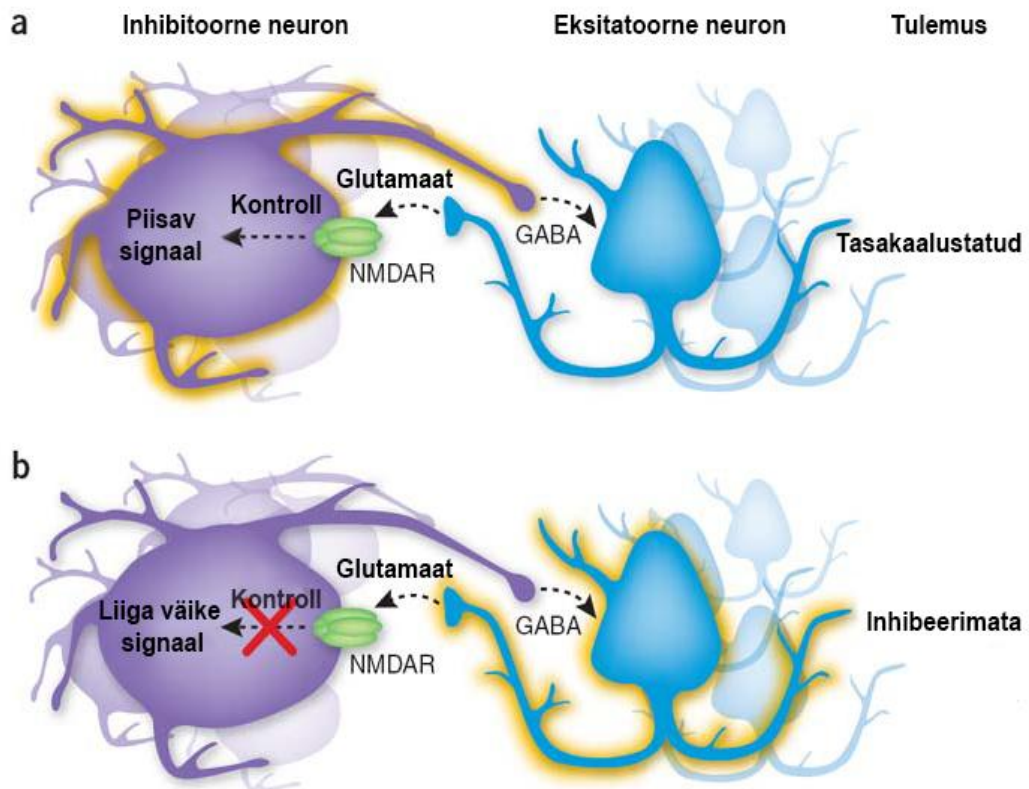
Skisofreenia on tõsine krooniline psüühikahäire, millele on iseloomulikud mõtlemise ja tajumise tõsised kõrvalekalded ning tuimenenud või ebaadekvaatne tundeelu. Häiritud on kõige põhilisemad funktsioonid, mis annavad normaalsele inimesele tema individuaalsuse, ainukordsuse ja suveräänsuse. Võivad esineda luulud, kus isiku mõtted ja teod on mõjutatud väliste jõudude poolt. Sagedasti esinevad negatiivsed kuulmishallutsinatsioonid, mis kommenteerivad isiku käitumist või mõtteid. Skisofreeniale omase mõttekäiguhäire puhul tulevad esile objektide kõrvalised või teisejärgulised tunnused ning neid kasutatakse peamiste oluliste tunnuste asemel. Nii muutub mõtlemine ebamääraseks, veidraks ja segaseks ning kõrvalseisjale verbaalselt arusaamatuks. Mõttekäigus on sagedased tõkestused ja seosetus. Meeleolu on iseloomulikult lame, kõikuv või ebaadekvaatne. Sümptomid jagatakse kolme gruppi, positiivsed (hallutsinatsioonid, segane mõttetegevus, luulumõtted), negatiivsed (motivatsiooni kadumine, afektiivne tuimus, kõnehälvatus, sotsiaalne inaktiivsus, apaatia) ja kognitiivsed (tähelepanu, mälu ning otsustusvõime puudulikkus) (Mirsky, 1988; Gold jt, 1994; Andreasen, 1995).

Skisofreenia esinemissagedus on ülemaailmselt ligikaudu 1%. Skisofreenia sümptomid avalduvad enamasti progresseeruvalt meestel pärast noorukiiga (16.-25. eluaastal) ja naistel hilisemas eas (40.-60. eluaastal) (Lewis ja Lieberman, 2000). Skisofreenia kujunemist mõjutab geneetilise komponendi kõrval vähemal määral kasvukeskkond. Erinevad keskkonnad võivad haiguse kulgu võimendada või pärssida (van Os jt, 2010). Skisofreenia diagnoosimiseks kehtib nõue, mis sätestab kuuajalise või pikema perioodi, mille vältel peab avalduma vähemalt üks väga selgelt väljendunud sümptom (nõrgemalt väljendunult kaks või rohkem) (Andreasen, 1995). Skisofreeniale eelneb enamasti psühhoos. Psühhoosi korral kaotab patsient diagnoosi eelselt kontakti reaalsusega. Reaalsustaju häirumine võib olla lühiajaline pöörduv seisund umbes 16% juhtudest või enamasti raskekujuline skisofreeniasümptomite avaldumine (Insel, 2010). Tagasivaatavalt võib selguda psühhoosile eelnenud nädalate- või isegi kuudepikkune prodromaalperiood, mille käigus kadus huvi töö, sotsiaalse tegevuse, oma välimuse ja hügieeni vastu koos üldise ärevuse ning kerge depressiooniga. Üldiselt välistatakse enne skisofreenia diagnoosi kõik muud psühhoosi põhjustajad – kesknärvisüsteemi (KNS) vigastused, infektsioonid ja ravimite või narkootikumide tarbimine. Diagnoosi korral alustatakse sümptomite leevendamiseks ravi antipsühhootikumidega.

Teaduskirjanduses on välja kujunenud kaks peamist hüpoteesi, mis kirjeldavad skisofreenia võimalikku kujunemist. Üks neist põhineb neurotransmitteril dopamiin. Dopamiini hüpoteesi korral väidetakse, et dopamiini liigne vabanemine põhjustab skisofreenia sümptomeid. Positronemissioontomograafia (PET) uuringud on näidanud aktiivsemat dopamiini sünteesi ja vabanemist skisofreeniapatsientide juttkehas ja keskajus (Howes jt, 2012; Howes jt, 2013). Lisaks imiteerib amfetamiini manustamine, mille tulemusel vabaneb täiendavalt dopamiini, skisofreeniale omaseid sümptomeid. Seda hüpoteesi on kinnitanud ka eksperimendid dopamiini retseptor 2 (D2) retseptorite blokaatoritega, mis pärsivad psühhoosile iseloomulikke sümptomeid (Carlsson, 1988; Howes jt, 2009). Tänapäevases kliinilises praktikas kasutatavad ravimid põhinevad siiani D2 retseptori blokeerimisel. Paraku ei suudeta ainult D2 blokaatorite abil kognitiivseid puudujääke kompenseerida (Insel, 2010).

Kognitiivsete puudujääkide uurimisel pakuti välja teine hüpotees, mis põhineb neurotransmitteril glutamaat (Gordon, 2010). Kognitiivseid võimeid seostatakse eelkõige frontaalkoore ning hipokampusega (Lewis jt, 2005). Ajukoores ja hipokampuses esinevad põhiliselt kahte tüüpi neuronid: eksitatoorsed, mis väljastavad signaale teistele neuronitele ning inhibitoorsed interneuronid, mis tasakaalustavad eksitatoorsete neuronite tööd (Kawaguchi ja Kubota, 1997).

Eksitatoorsetel neuronitel asuvad glutamaadi retseptorid ehk niinimetatud N-metüül-D-aspartaat (NMDA) retseptorid (NMDAR). Gamma amino võihappe (GABA) väljastamise käigus inhibeerivad interneuronid tagasiside mehhanismil eksitatoorseid glutamaadineuroneid (joonis 1). Inhibitoorsete interneuronite töö tulemusel tasakaalustub eksitatoorsete neuronite tegevus ja närvivõrgud on võimelised läbi viima kontrollitud arvutusi. Skisofreenia korral on NMDA retseptorite aktiivsus kõrgem ning inhibitoorsed GABAergilised interneuronid ei suuda pidurdada tugevamat signaali madala GABA sünteesi või vabanemise tõttu. Selline tasakaalutus põhjustab närvivõrkude kõrvalekalandumist normaalsest (Gordon, 2010).



Joonis 1. Glutamaadi hüpoteesi illustratsioon. a - kujutatud on toimiv tagasiside kahe neuroni, eksitatoorse ja inhibitoorse vahel; b - kujutatud on mittetoimiv tagasiside kahe neuroni, eksitatoorse ja inhibitoorse vahel. Muudetud Gordon, 2010 järgi.

1.1.2. EGF perekond

1.1.2.1. EGF ligandid

Epidermaalne kasvufaktor (EGF, *epidermal growth factor*) perekonda kuuluvad lisaks EGFile veel 13 järgmist ligandi: transformeeriv kasvufaktor alfa (TGF α , *transforming growth factor alpha*) (Derynck jt, 1984), hepariinseoseline EGF-laadne kasvufaktor (HB-EGF, *heparin-binding EGF-like growth factor*) (Higashiyama jt, 1991), amfireguliin (AR, *amphiregulin*) (Shoyab jt, 1989), epireguliin (EPR, *epiregulin*) (Toyoda jt, 1995), beetatselluliin (BTC, *betacellulin*) (Sasada jt, 1993; Shing jt, 1993), epigeen (EPG, *epigen*) (Strachan jt, 2001), neureguliin-1 (NRG1) (Holmes jt, 1992), neureguliin-2 (NRG2) (Higashiyama jt, 1997), neureguliin-3 (NRG3), neureguliin-4 (NRG4) (Hobbs jt, 2002), neureguliin-5 (NRG5; tomeregulin) (Uchida jt, 1999) ja neureguliin-6 (NRG6; neuroglycan C) (Kinugasa jt, 2004).

EGF perekonnas eristatakse EGF ligande ja neureguliine (NRG). Kuid mõlemad alamperekonna ligandid seonduvad ErbB1-4 retseptortürosiinkinaasidega ja reguleerivad aju arengut ning funktsionaalsust (Nawa jt, 2014). Kuigi EGF ja NRG perekondi on vaadeldud ka eraldi, siis käesolevas töös käsitletakse neid koos ühe suure ligandide perekonnana (tabel 1).

Tabel 1. ErbB molekulid, nende ligandid ja adapterid/efektorid. Koostatud Iwakura ja Nawa, 2013 järgi.

ErbB retseptor	Seondumispartner	Ligand
ErbB1	ErbB1 ErbB2 ErbB3 ErbB4	EGF BTC TGF α EPG HB-EGF EPR AR
ErbB2	ErbB1 ErbB3 ErbB4	Pole teada
ErbB3	ErbB1 ErbB2 ErbB4	NRG1 NRG2 NRG6
ErbB4	ErbB1 ErbB2 ErbB3 ErbB4	HB-EGF NRG3 BTC NRG4 EPG NRG5 NRG1 NRG6 NRG2

TGF α produktsioon suprakiasmaatilises tuumas reguleerib interaktsioonis ErbB1ga ööpäevarütmi (Kramer jt, 2001; Snodgrass-Belt jt, 2005). TGF α on laialt ekspresseerunud aju eri piirkondades – nii neuronites kui ka gliiarakkudes (Seroogy jt, 1993).

HB-EGF mRNA ekspressioon on tuvastatud neuronites ja oligodendrotsüütides, eriti väikeajus, hipokampuses, ajukoores, subventrikulaarses alas ja ajutüve tuumades. HB-EGF interakteerub ErbB1 ja ErbB4ga. Arvatakse, et HB-EGF on arenevas ajus üks olulisemaid EGFRi ligande ning omab mitogeenset rolli neuroplastidele (Nakagawa jt, 1998).

Näriliste puhul on näidatud, et AR osaleb aktiivselt keratinotsüüdirakkude arengu reguleerimises ning tõrjub kõrvale EGF α ja TGF α (Shoyab jt, 1989). Teiste rakusüsteemide kasvustimulaatorina on AR palju nõrgem. Veel on näidatud, et AR inhibeerib inimesel nahavähi rakkude ja kasvajarakkude jagunemist, kuid samas stimuleerib normaalsete rakkude jagunemist (Shoyab jt, 1988). AR interakteerub ErbB1 retseptoriga, kuid on EGFist madalama afiinsusega.

EPR seondub ErbB1 retseptoriga ning omab tähtsat rolli epiteelirakkude ja fibroblastide arengus (Toyoda jt, 1995).

BTC on tugev silma võrkkesta pigmentepiteelirakkude ja veresoonkonna silelihasrakkude mitogeen. Närilistel on näidatud BTC mRNA laialdane ekspressioon erinevates kudedes – tüümuses, kopsus, südames, maksas, põrnas, peensooles, pankreases, neerus, lihastes, testistes ja emakas. BTC interakteerub ErbB1 ja ErbB4 retseptoritega (Shing jt, 1993).

EPG ekspresseerub täiskasvanud hiirte testistes, südames ja maksas. EPG interakteerub ErbB1 ja ErbB4 retseptoritega ning on epiteeli mitogeen (Strachan jt, 2001).

Stefansson koos kaastöötajatega (Stefansson jt, 2002; Stefansson jt, 2003) on leidnud tugevaid seoseid *NRG1* geeni ja skisofreenia vahel. NRG1 seondub ErbB3 ja ErbB4 retseptoritega ning funktsioneerib sünergiliselt koos EGFiga (Sweeney jt, 2001; Garratt jt, 2003). NRG1 ekspresseeritakse sünapsites, kus ta indutseerib neurotransmitterite retseptorite (nende hulgas glutamaadi retseptori) ekspressiooni ja aktivatsiooni (Stefansson jt, 2002).

NRG2 interakteerub ErbB3 ja ErbB4 retseptoritega ning indutseerib epiteeli-, närvi- ja gliiarakkude ning samuti teiste rakutüüpide arengut ning diferentseerumist (Ring jt, 1999).

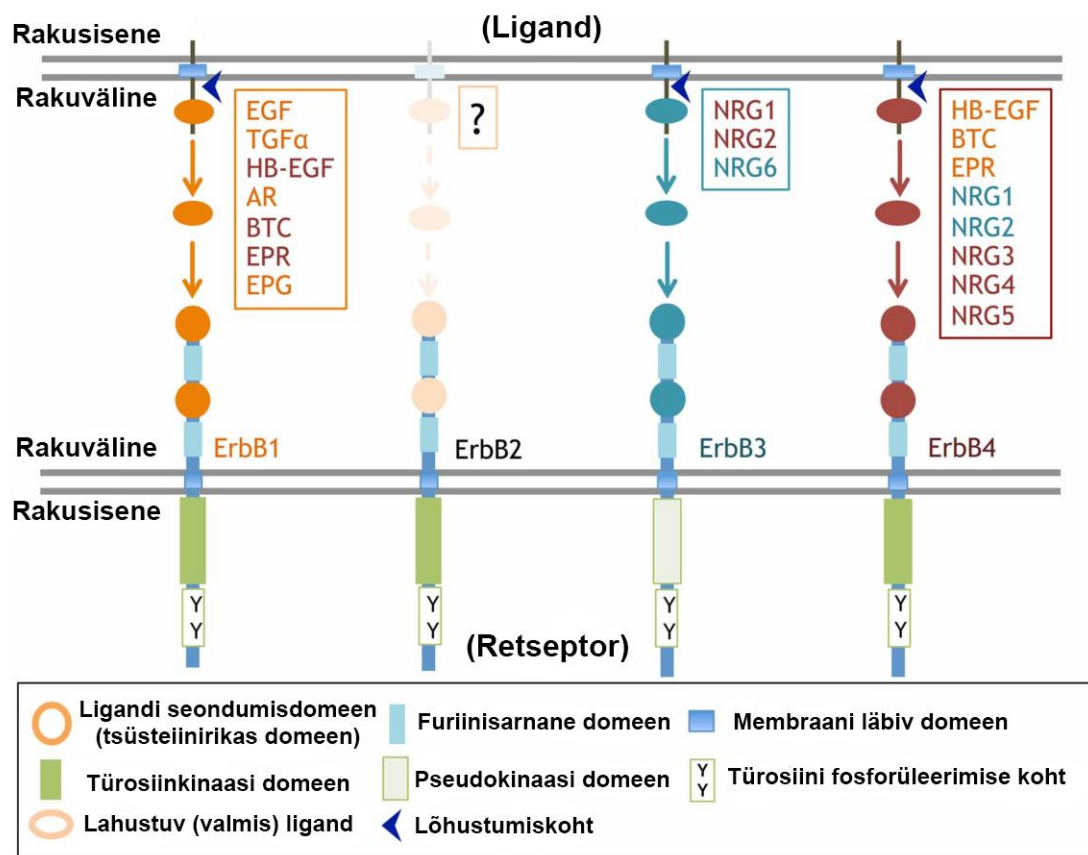
NRG3 on ErbB4 retseptori agonist (Hobbs jt, 2002). NRG3 ekspressioon on omane arenevale närvisüsteemile (Zhang jt, 1997).

NRG4 on ErbB4 retseptori agonist ja põhjustab retseptori keskpärast aktivatsiooni (Zhang jt, 1997). NRG4 kohta on vähe teada ning seetõttu pole selge ka tema täpne funktsioon.

NRG5 interakteerub ErbB4 retseptoriga ning on tuvastatud soole ja närvikudedes. NRG5 ekspressioon võib olla seotud embrüo normaalse arengu ning täiskasvanud organismi KNS talitlusega (Uchida jt, 1999).

NRG6 interakteerub ErbB3 retseptoriga ning ekspresseerub valdavalt ajus. NRG6 on seotud sünaptogeneesi ja Purkinje rakkude adhesiooniga (Kinugasa jt, 2004; Watanabe jt, 1995).

Enamik EGF perekonna ligandidest sünteesitakse algselt membraanile ankurduvate suurte eellasmolekulidena, mis viiakse sekreteeritavale ja lahustuvale kujule ning vabastatakse seejärel rakkudevahelisse ruumi, kus difusiooni järel toimub interakteerumine ErbB retseptoritega (joonis 2). Kõigil EGF perekonna liikmetel on ErbB retseptori türosiinkinaasidega ErbB1, ErbB2, ErbB3 ja ErbB4 interakteerumisel spetsiifilised seondumiseelisted. Ligandid soodustavad ErbB retseptordimeeride moodustumist ja partner ErbB molekuli transfosforüleerimist (Iwakura ja Nawa, 2013).



Joonis 2. ErbB retseptorid ning nende ligandid. Illustreeritud ErbB retseptorite molekulaarne struktuur ja nende ligandide proteolüütiline protsessimine. Muudetud Iwakura ja Nawa, 2013 järgi.

1.1.2.2. ErbB (EGF) retseptorid

ErbB retseptorvalgud on rakumembraani läbivad türosiinkinaasid, mis seovad EGF ligande. ErbB perekonnas on neli liiget (ErbB1-4) (Downward jt, 1984; Schechter jt, 1984; Semba jt, 1985; Kraus jt, 1989; Plowman jt, 1993). Nii rakuvälised kui ka -sisesed domeenid on märkimisväärselt konserveerunud, vastavalt 40-50% ja 60-80% (joonis 2) (Nawa jt, 2014).

ErbB retseptorite perekonna liikmed on levinud mitmetes organites ja rakutüüpides, mis on ektodermaalset ja mesodermaalset päritolu (tabel 2). ErbB1 ja ErbB4 retseptoreid ekspresseeritakse näiteks dopaminergilistes ja GABAergilistes neuronites. ErbB1, B2 ja/või B3 esinevad peamiselt oligodendrotsüütides, astrotsüütides ning nende eellastes (Iwakura ja Nawa, 2013).

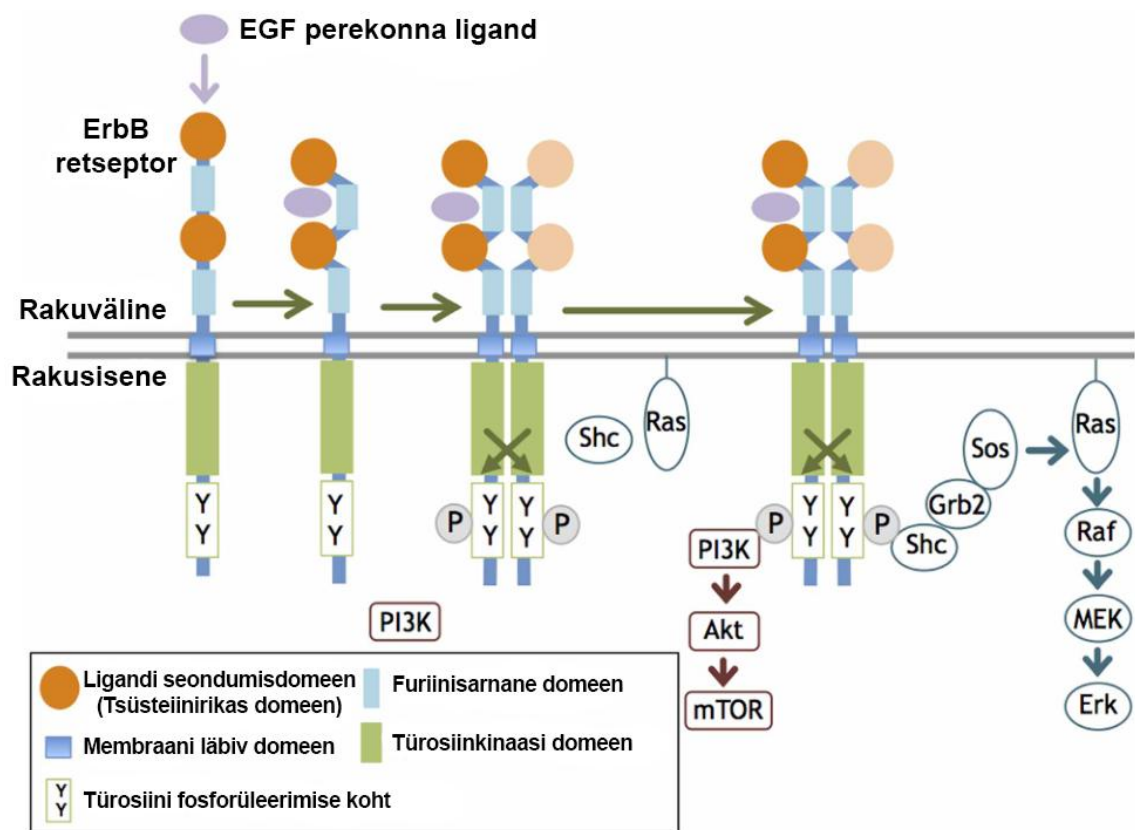
ErbB retseptorite vahendatud signalisatsiooni reguleeritakse mitmel tasandil – alternatiivne splaissimine, proteolüütiline protsessimine, rakusisene translokatsioon ja ko-tagasisideistus (Iwakura ja Nawa, 2013). ErbBide funktsioonid hõlmavad erinevaid rakulisi protsesse – rakujagunemine, areng, migratsioon ja adhesioon (tabel 2).

ErbB molekulide afiinsust ligandite suhtes reguleerib türosiinkinaasi domeenis toimuv struktuuri muutus, homo- ja heterodimerisatsioon (Olayioye jt, 2000). Seejuures ei ole oluline millise ErbB alamtüübiga ligand seondub, kuna regulatoorne signaaliülekanne toimub läbi ErbB dimeeride fosforüleerimise ning kantakse üle mõlemalt ErbB molekulilt (joonis 3) (Higashiyama ja Nanba, 2005; Iwakura ja Nawa, 2013).

Kuna ErbB1 on kõige laialdasemalt uuritud EGF-i retseptor ning sellel on leitud ka kaudseid seoseid psühhooosi ning skisofreeniaga, siis sellest lähtuvalt on käesolevas töös just ErbB1le pööratud suuremat rõhku.

Tabel 2. ErbB1-4 funktsioonid ja jaotumine ajus (Iwakura ja Nawa, 2013).

Retseptor	Kude	Rakutüüp	Funktsioon
ErbB1	Subventrikulaarne ala	Närvisüsteemi tüvirakk	Rakujagunemine/ migratsioon
	Keskaju	Dopaminergiline närvirakk	Elulemus/ areng
	Ajukoor, hipokampus	GABAergiline närvirakk astrotsüüt	Sünaptiliste funktsioonide regulatsioon rakujagunemine/ diferentseerumine
	Väikeaju	Purkinje rakk granulaarrakud astrotsüüt	Areng/ rakujagunemine
	Ajuripats	Laktotroof	Prolaktiini ja kortisooli tootmine ja vabastamine
ErbB2	Väikeaju, ajukoor, hipokampus, keskaju jt.	Oligodendrotsüüt astrotsüüt radiaalne gliiarakk	Rakujagunemine/ diferentseerumine
ErbB3	Ajukoor, hipokampus jt.	Oligodendrotsüüt	Raku küpsemine/ müelinatsioon
ErbB4	Ajukoor, hipokampus	GABAergiline närvirakk astrotsüüt oligodendrotsüüt	Sünaptiliste funktsioonide nõrgendamine rakujagunemine/ diferentseerumine
	Väikeaju	Granulaarrakud	Sünaptiliste funktsioonide regulatsioon
	Keskaju	Dopaminergiline närvirakk	Elulemus, sünaptiliste funktsioonide nõrgendamine



Joonis 3. ErbB retseptorite dimerisatsioon ja aktivatsioon. Ligandi interaktsioon ErbB1, B3 ja B4ga tõstab nende afiinsust ning indutseerib ErbB1-4 homo- või heterodimerisatsiooni. Dimerisatsioon aktiveerib türosiinkinaasi domeeni ning võimaldab sellel ErbB partneri tsütoplasmaatilise piirkonna fosforüleerimist. Muudetud Iwakura ja Nawa, 2013 järgi.

ErbB1 ekspresseeritakse hipokampuse ja neokorteksi interneuronites ning väikeaju Purkinje rakkudes (Werner jt, 1988). ErbB1 ja ErbB4 ekspresseeruvad keskaju piirkonnas, musttuuma ja juttkeha vahelistes (nigrostriataalsetes) dopamiini neuronites (Abe jt, 2009a). ErbB1 indutseerib dopamiinergiliste neuronite elulemust (Iwakura jt, 2005; Iwakura jt, 2011; Namba jt, 2009) ja on seotud mitmete teiste rakuliste protsessidega (tabel 2), nende hulgas rakkude jagunemine (Iwakura ja Nawa, 2013). ErbB1 valgu tase KNSis on kõige kõrgem raseduse ajal (loote staadiumis) ning väheneb hilisema arengu käigus. Varajane ekspressioonimuster kattub subventrikulaarse ala tüvirakkude asetusega (Abe jt, 2009a). ErbB1 aktivatsioon algatab närvisüsteemi tüvirakkude ja otseselt neist arenevate rakkude jagunemise ja migratsiooni (Aguirre jt, 2005, Aguirre jt, 2010).

1.1.2.3. EGF geeni roll esmase psühhoosi kujunemisel

EGF on arvatavasti kõige rohkem uuritud aju arengut mõjutav ligand (Futamura jt, 2002). EGF on tugev mitogeen ja neurotroofne faktor, mis mõjutab neuronite elulemust ja talitlust (Futamura jt, 2002; Plata-Salaman, 1991). EGF valgu tase varieerub aju erinevates osades, mis võib viidata lokaalsele sünteesile (Plata-Salaman, 1991). Ajusiseselt on EGFi kontsentratsioon märgatavalt suurem sünaapsites, mistõttu võib eeldada ka neuromoduleerivat funktsiooni (Plata-Salaman, 1991). EGF läbib kergelt hematoentsefaalset barjääri ja võib ajju jõuda ka läbi vereringe (Futamura jt, 2003). Näiteks roti ajus on EGFi tase 4-13 korda kõrgem kui seerumis (Plata-Salaman, 1991).

EGF indutseerib türosiini hüdroksülaasi (TH) ekspressiooni, mille tulemusel tõuseb dopamiini süntees ja dopamiini metaboliidi 3,4-dihüdroksüfenüüläädikhappe (DOPAC) tase (Futamura jt, 2003). Samuti suurendab EGF pikaajalist dopaminergiliste närvirakkude elulemust kultuuris (Yamada jt, 1997) ning dopamiini ja serotoniini omastamist, kuid pärsib samal ajal glutamaadi vabanemist (Yamada jt, 1997; Ferrari jt, 1991; Gil jt, 2003).

Skisofreeniaga seoses on laialdaselt uuritud EGF ja NRG1 valke. *DeCode Genetics Inc.* teatas 2002. aastal geneetilisest seosest *NRG1* geeni ja skisofreenia vahel (Stefansson jt, 2002). Skisofreenia patsientide *post mortem* ajukudedes on tuvastatud ebatavaline EGF ja ErbB1 ekspressioon (Futamura jt, 2002). Enamasti oli skisofreeniapatsientide eesaju piirkondades ErbB1 üle ekspresseeritud (Futamura jt, 2002).

Täiendavalt on näidatud ka seost valgeaine ja müeliinstruktuuride defitsiidi ning skisofreenia vahel (Davis jt, 2003; Flynn jt, 2003). ErbB3 signaalidel on oluline roll oligodendrotsüütide müelinisatsiooni ning närviimpulsside juhtimisel (Stewart ja Davis, 2004). Aston ja kolleegid (2004) leidsid, et skisofreenia patsientide temporaalsagara keskkäärus müelinisatsiooni ja oligodendrotsüütidega seotud geenide, nende hulgas *erbB3*, mRNA tasemed olid alla reguleeritud (Aston jt, 2004).

EGF ja NRG1 mõju skisofreeniale on uuritud erineva vanusega hiirtel ja rottidel (vastsündinud, noored ja noored täiskasvanud) manustades nahaaluse süstimisega EGF ligandi (Tohmi jt, 2005; Futamura jt, 2003). Järgnevalt jälgiti katseloomade käitumuslikke näitajaid. Paljudel vastsündinutel, kellele EGFi manustati, ilmnesid mitmed käitumuslikud puudused, nagu näiteks madalam tulemus eelsignaali ehmatuse pärssimise katsetes (PPI; *prepulse inhibition of startle*), hirmureaktsiooni varjatud kahjustus, vähenenud sotsiaalne käitumine ja suurenenud

tundlikkus metamfetamiini ja D2 retseptorite agonistide suhtes (Tohmi jt, 2005; Futamura jt, 2003; Mizuno jt, 2004; Sotoyama jt, 2007). Enamikku neist leidudest on seostatud skisofreenia käitumuslike endofenotüüpidega. Kuna PPI langust tuvastati ka 6. sünnijärgsel kuul, siis eeldatakse, et eelmainitud käitumuslikud kahjustused on püsivad (Nawa jt, 2014).

EGFi retseptorid ErbB1 ja ErbB4 on leitavad kõigist skisofreenia neuropatoloogiaga seotud rakupopulatsioonidest, GABAergilistes ja dopaminergilistes närvirakkudes ning glias (Futamura jt, 2002). ErbB1 ligandid reguleerivad GABAergilist neuronite arengut neokorteksis alla ning nõrgendavad neuronite glutamaadi retseptorite kanalite aktiivsust (Namba jt, 2006; Nagano jt, 2007). Erinevate mudelite peal läbi viidud uurimused näitavad patoloogilist seost ErbB1 hüpersignalisatsiooni ja skisofreenia vahel. Tõenäoliselt konkureerib ErbB1 NRG/ErbB4 signalisatsiooniga, nagu on välja pakutud varasemates vähiuuringutes (Moghal ja Sternberg, 1999; Pitfield jt, 2006, Das jt, 2010). Ka loomkatsetes on nähtud, et akuutne ja subkrooniline aju aktiveerimine ErbB1ga kutsub esile dopamiini vabanemise aju juttkehas või *globus pallidum*is ning see põhjustab skisofreeniale omaseid käitumishäireid (Futamura jt, 2003; Tohmi jt, 2005; Mizuno jt, 2008; Sotoyama jt, 2011).

Kindlasti tuleb kõigi leidude osas arvesse võtta, millist ErbB splaissingu isovormi konkreetsetes närvisüsteemi rakus ekspresseeritakse. Mõnedel ErbB isovormidel võib olla aktiveeriv ja mõnedel inhibeeriv funktsioon. Hetkel on teada vaid see, et *erbB* geenide produktid on esindatud mitmete aju struktuuride kindlates neuronites või gliiarakkudes, kuid ei teata nende ErbB isovormide täpseid reaalseid struktuure (Iwakura ja Nawa, 2013). Täpsemaks ErbBde funktsiooni mõistmiseks närvisüsteemis on vaja läbi viia täiendavaid uuringuid. Viimase aja leiud viitavad, et EGFi tase võib olla üks esimese psühhooosi episoodi (FEP; *first-episode psychosis*) markereid (Haring jt, 2015). Antipsühhootiliste ravimite manustamine põhjustas FEP patsientide kliinilise pildi silmapaistvat paranemist ning skisofreenia positiivsete sümptomite leevendumist. Sümptomite leevendumine korreleerus EGFi madalama tasemega. Uurimuses jälgitud ja mõõdetud tsütokiinide ja kasvufaktorite hulgast korreleerus EGF kõige tugevamalt FEPI ja ravimite mõju edukusega (Haring jt, 2015). Ka käesolevas töös keskendutakse *Egfi* taseme muutuste detekteerimisele.

1.2. Psühhoosi mudeldamine

1.2.1. Skisofreenia loomudelid

Skisofreenia on komplekshaigus erinevate põhjuste, progresseerumismustri ning kliiniliste sümptomitega, mistõttu on ühtse loomudeli loomine keeruline. Siiski on kasutusel mitmeid kümneid erinevaid psühhoosi ja skisofreenia loomudeleid, mille abil saab uurida skisofreenia erinevaid sümptomeid ja aspekte ning testida erinevaid põhjuslikke seoseid ja teooriaid. Mitmed loomudelid kattuvad oma metodoloogia ja/või sisu poolest märkimisväärselt. Üldiselt saab mudeleid tekkemehhanismi alusel jagada nelja gruppi: arengulised, ravimindutseeritud, kahjustusjärgsed või geneetilise manipulatsiooni tulemusel tekkinud (Jones jt, 2011).

Skisofreenia loomudelite arendamisega on seotud mitmed raskendavad asjaolud. Üks peamisi murekohti on kognitiivse sümptomaatika tõetruu mudeldamine inimesega võrreldes kognitiivselt vähem arenenud loomas. Lisaks juba eelnevalt mainitud kliiniliste sümptomite heterogeensus, mis muudab haiguse kulgemise individuaalseks ja üldises loomudelis raskesti taasloodavaks (Marchotte jt, 2001). Pigem keskenduvad skisofreenia loomudelid spetsiifilisemate põhjuslike seoste või erinevate võimalike molekulaarsete mehhanismide testimisele. Mudelite täpsust hinnatakse selle põhjal, kui hästi tulemused erinevates käitumiskatsetes kattuvad skisofreenia patsientide tulemustega. Kattuvused käitumuslikul tasandil ja nende taustal toimuvad struktuursed muutused võivad peegeldada sarnaseid protsesse inimese ajus (Marchotte jt, 2001).

Skisofreenia ravimindutseeritud loomudelid põhinevad erinevate virgatsainesüsteemide mõjutamisel. Kuna teadmised kognitiivsete protsesside ja mõtlemise mehhanismidest on praegu veel ebapiisavad, on selliste mudelite valiidsus suhteliselt piiratud. Siiski võib farmakoloogiliste loomudelite ennustuslik valiidsus olla suhteliselt hea, sest üldjuhul kasutatakse nendes loomudelites inimestel skisofreenia sümptomeid esile kutsuvaid või ägestavaid aineid (Costall ja Naylor, 1995). Üheks parimaks võib pidada skisofreenia dopamiini hüpoteesil põhinevat farmakoloogilist mudelit, mida on kasutatud juba aastakümneid ning mis põhineb amfetamiini manustamisel. Eelnevast lähtuvalt otsustati ka selles töös kasutada katseloomadel psühhoosi mudeldamiseks just amfetamiini manustamist.

1.2.2. Amfetamiini manustamisega indutseeritud psühhoos

Amfetamiinist põhjustatud psühhoosi kirjeldati esmakordselt juba 1950ndatel. Amfetamiini poolt indutseeritud psühhoosi korral ilmneb kliiniline pilt, mis sarnaneb skisofreenia positiivse sümptomaatikaga (Jones jt, 2011). Esimene juhtiv skisofreenia põhjuseid seletav teooria tugines mesolimbilise dopamiinisüsteemi hüperaktiivsusele (Murray jt, 2008), mistõttu püüti samu iseärasusi jäljendada ka esimestes ravimindutseeritud loomudelites.

Skisofreeniaga kaasnevat mesolimbilist dopaminergilist hüperaktiivsust võib põhjustada pre- või postsünaptiliste mehhanismide tasakaalustamatus. Amfetamiinist tingitud presünaptilisele hüperaktiivsusele viitavad ülemäärane dopamiini vabanemine (Abi-Dargham jt, 1998; Breier jt, 1997; Laruelle, 1998) ja kõrgeenenud L-DOPA dekarboksülaasi tase (Laruelle, 1998). Näidatud on ka, et amfetamiini ja sarnaste ainete nagu 3,4-metüleendioksümetamfetamiini (MDMA) manustamine põhjustavad tervetes katsealustes psühhootilisi sümptomeid (Angrist ja Gershon, 1970; Morland, 2000). Lisaks on mitmetel skisofreenia patsientidel esinenud amfetamiini või metüülfenidaadi (Ritalin) manustamisel psühhootiliste sümptomite ägenemine isegi annustes, mis ei mõjutanud kontrollpatsiente (Lieberman jt, 1994; Lieberman jt, 1987; Levy jt, 1993).

Postsünaptiliselt võib dopamiini suhtes suurenenud tundlikkust põhjustada nii dopamiiniretseptorite kui ka signaaliülekanne raja teiste komponentide arvu suurenemine.

Kui esialgu klassifitseeriti dopamiiniretseptorid erinevate biokeemiliste ja farmakoloogiliste profiilide alusel klassidesse D₁ ja D₂ (Kebabian, 1979), siis nüüd jagunevad nad kahte erinevasse retseptorite perekonda (Baldessarini ja Tarazi, 1996; Hartman ja Civelli, 1997; Lachowicz ja Sibley, 1997). Kõik tüüpilised antipsühhootikumid on D₂ retseptorite antagonistid (Seeman jt, 1976; Creese jt, 1976; Seeman ja Kapur, 2000). *Post-mortem* mõõtmised on näidanud, et skisofreenia korral on D₂ retseptorite tihedus suurenenud (Laruelle, 1998; Zakzanis ja Hansen, 1998; Wong jt, 1986; Abi-Dargham jt, 2000). Skisofreenia puhul on täheldatud muutusi ka teistes dopamiiniretseptorites (Gurevich jt, 1997; Den Boer jt, 1995; Seeman jt, 1997).

Amfetamiini ja teiste sarnaste psühhostimulantide manustamine kutsub loomkatsetes esile konkreetselt mõõdetavaid käitumuslikke muutusi nagu liikumisaktiivsuse tõus ja stereotüüpia (Kokkinidis ja Anisman, 1980; Sharp jt, 1987). Amfetamiinist tingitud liikumisaktiivsuse tõus tuleneb dopamiini suurenenud vabanemisest naalduvast tuumast (nAcc) ja dorsaalsest juttkehast (Robinson ja Becker, 1986; Featherstone jt, 2007a). Võrreldes skisofreenia

patsientidel täheldatud häiretega on nende motoorsete muutuste tähtsus vaieldav, kuid võimaldab psühhoosi/skisofreenia loommudeleid omavahel võrrelda.

Antipsühhootikumidega ravimise tulemusena nõrgeneb amfetamiini manustamisest tingitud stereotüüpne käitumine (Pijnenburg jt, 1975), mis samuti toetab kasutatud mudeli usaldusväärsust. Kroonilist amfetamiini manustamist peetakse ühekordsest süstimisest tõhusamaks skisofreenia sümptomite mudeldamise viisiks (Featherstone jt, 2007a), sest see põhjustab närilistes mitmeid struktuurilisi ja neurokeemilisi ümberkorraldusi, mis võivad avalduda ka mitmete nähtavate käitumuslike muutustena. Struktuurilistest ümberkorraldustest saab välja tuua närviraku dendriitide harude ja jätkete tiheduse suurenemise nAcc-i rakkudes ja prefrontaalkoores (PFC) (Robinson ja Kolb, 1999).

Krooniliselt amfetamiini saanud rottidel väheneb vastusena uuele amfetamiini annusele ka atsetüülkoliini vabanemine PFCs ning seda seostatakse püsivat tähelepanu nõudvate ülesannete sooritamise võimekusega (Sarter jt, 2009). Käitumuslikul tasandil põhjustab amfetamiini krooniline manustamine püsivat ülitundlikkust ning võimendab hüperaktiivsust vastusena akuutsele amfetamiini manustamisele (Robinson ja Becker, 1986; Featherstone jt, 2008). Eelnevalt mainitud hüperaktiivsuse hoiab ära väike haloperidooli või klosapiini annus (Meng jt, 1998). Samuti kaitseb klosapiini ja vähemal määral ka haloperidooli manustamine amfetamiinist põhjustatud tähelepanu languse vastu (Martinez ja Sarter, 2008). Krooniline amfetamiini manustamine näib kahjustavat mõningate PFCst sõltuvate ülesannete sooritust, kuid seejuures ei muutu hipokampuse funktsionaalsus (Jones jt, 2011). Morrise vesilabürindi katse tulemustest on näha, et korduval amfetamiini manustamisel puudub efekt ruumilisele visuaalsele õppimisele ning mälu omandamisele ja säilitamisele (Russig jt, 2003; Featherstone jt, 2008). Käesolev töö keskendub *Egfi* ekspressiooni muutuste detekteerimisele tulenevalt frontaalkoore töö häirumisest amfetamiini poolt indutseeritud psühhoosi mudelis.

Kokkuvõtteks võib öelda, et dopamiini otsene määrav roll skisofreenia kujunemisel ei ole küll piisavalt tõendatud (Lipska ja Weinberger, 2000; Davis jt, 1991; Joyce ja Meador-Woodruff, 1997; Grace, 2000), kuid sellest hoolimata on dopamiini hüpotees juba aastakümneid skisofreenia uurimise üks põhilisi alustalasid. Dopamiini vabastava amfetamiini krooniline manustamine ei imiteeri skisofreenia negatiivseid ega kognitiivseid sümptomeid, kuid põhjustab üldiselt psühhoosile sarnanevaid muutusi käitumises nagu hüperaktiivsus ja stereotüüpia (Jones jt, 2011).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

1. Mudeldada psühhoosi kahes erinevas hiireliinis (BL6 vs SV129) kroonilise amfetamiini manustamise abil
2. Uurida *Egf* geeni ekspressioonitaseme muutust frontaalkoores amfetamiini kroonilisel manustamisel põhinevas psühhoosimudelil
3. Uurida *Egf* geeni ekspressioonitaseme muutust frontaalkoores vastusena amfetamiini akuutsele (ühekordsele) manustamisele

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Katseloomad

Käesolevas töös kasutati metsiktüüpi laborihiiri (*mus musculus*), 129S6SVEV/tu ja C57bl6/N/tu. Hiired saadi Tartu Ülikooli Bio- ja Siirdemeditiini Instituudi Katseloomakeskuse vivaariumist (Ravila 14B, Tartu). Loomad elasid standardsetes loomapuurides ($42,5 \times 26,6 \times 15,5$ cm) kuni 8 looma puuris, temperatuuril 22 ± 1 °C ja 12 h/12 h valge-pime režiimil (tuled kustusid kl 19:00). Toit ja vesi olid hiirtele vabalt kättesaadavad (*ad libitum*). Puurides kasutati haavapuidust allapanu (2 cm kiht) ja haavapuidust pesamaterjali (0,5 l), mida vahetati iganädalaselt.

Mõlema hiireliini isenditest moodustati 3 katsegruppi (kontroll, akuutne ja krooniline – igas 18 isendit). Kontrollgrupi hiirtele süstiti 3.-13. päevani füsioloogilist lahust (0,9% NaCl). Akuutsele grupile süstiti 3.-12. päevani füsioloogilist lahust ning 13. päeval amfetamiini lahust. Kroonilisele grupile süstiti 3.-13. päeval amfetamiini lahust. Esimesel 2 päeval katseloomi ei süstitud, need päevad olid mõeldud katsekeskkonnaga kohanemiseks. Amfetamiin lahustati füsioloogilises lahuses ning manustatav doos oli 3 mg/kg. Hiiri kaaluti enne igat süstimist ning kõik süstitavad lahuste kogused olid vastavuses kehakaaluga – 10 ml/kg. Süstimised teostati intraperitoneaalselt (kõhuõõnde) 30 minutit enne katseseadmesse asetamist.

Liikumisaktiivsuse testis ja qPCR analüüsis kasutati isaseid hiiri, kes olid katsete alguses 6-9 nädalat vanad. Katseloomad surmas vastava koolituse saanud spetsialist läbi tservikaalse dislokatsiooni. Pärast surmamist eemaldati pea keha küljest ning aju koljust. Eemaldatud aju prepareeriti jääl vastavalt hiire aju atlasele (Franklin ja Paxinos, 1997). Eraldatud frontaalkoor külmutati koheselt vedelas lämmastikus ning säilitati temperatuuril -80 °C.

Töö autor ei viinud loomkatseid läbi ise, kuid osales katsete läbiviimisel vaatljana. Kõik loomkatsed teostas vastava koolituse läbinud spetsialist ning nende läbiviimine oli kooskõlas Eesti Vabariigi põllumajandusministeeriumi Loomkatseprojekti loakomisjoni loaga (4.05.2016 nr 87).

2.2.2. Liikumisaktiivsuse katse

Liikumisaktiivsuse katse on standardne meetod, mida kasutatakse motoorse käitumusliku fenotüübi hindamisel. Liikumisaktiivsuse mõõtmisel kasutati spetsiaalset fotoelektrilist jälgimissüsteemi (TSE, Technical & Scientific Equipment GmbH, Saksamaa), mis oli ühendatud arvutiga. Liikumiskatse viidi läbi ajavahemikul kell 8.00 kuni 19.00. Hiired viidi katseruumi üks tund enne katset, et nad kohaneksid katseruumi oludega. Liikumisaktiivsuse mõõtmisel asetati hiired 30 minutiks poolläbipaistvatesse pleksiklaasist kastidesse (44 x 44 x 45 cm), mille sisemuses oli valguse tugevus 400 luks. Jälgimissüsteemi arvutiprogramm registreeris katse parameetrid automaatselt. Pärast iga katsefaasi lõppu, kui katseloom võeti kastist välja, puhastati kast hoolikalt 5% etanooli lahusega ning seejärel kuivatati. 30-minutilise jälgimisperioodi jooksul mõõdeti järgmised liikumisaktiivsust iseloomustavad parameetrid: (1) läbitud distants, (2) püstumised.

2.2.3. RNA eraldamine ja DNAasi töötlus

Frontaalkoore rakkude totaalne RNA eraldati ajukoe homogeniseerimisel. Homogeniseerimisel kasutati TRI® reagenti (Invitrogen) ning tootja juhiseid mõningate modifikatsioonidega. Esimese etapina homogeniseeriti ajukude jääl 100 µl TRI® reagentis. Seejärel proovid uhmerdati ja lisati ülejäänud osa reagentist kuni soovitud 500 µl mahuni. Järgnevalt inkubeeriti jääl 5 minutit ja lisati kloroformi 100 µl (Sigma-Aldrich) ning tuube raputati jõuliselt 15 sekundit. Inkubeeriti veel 5 minutit jääl ja tsentrifuugiti eeljahutatud tsentrifuugis 12,000 g (10630 rpm, r=95 mm, Eppendorf 5810/R Bench Top) 15 min 2 °C juures. Proovid asetati tagasi jääle ning RNAd sisaldav vesifaas tõsteti ümber uude katsutisse. RNA sadestamiseks lisati 250 µl -20 °C isopropanooli (Naxo BioTop). Proovid segati, hoiti 15 minutit jääl ja tsentrifuugiti 12,000 g (10630 rpm, r=95 mm, Eppendorf 5810/R Bench Top) 10 min 2 °C juures. Järgnevalt eemaldati isopropanool ning lisati 1 ml -20 °C 75% etanooli. Proovid tsentrifuugiti 7500 g (5974 rpm, r=95 mm, Eppendorf 5810/R Bench Top) 10 min 2 °C juures. Eelnevat 75% etanooli töötlust teostati kaks korda. Etanool eemaldati ning proovil lasti 5 minutit toatemperatuuril kuivada. Seejärel lahustati sadestatud RNA 40 µl vees. RNA kontsentratsioonid mõõdeti NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetril (NanoDrop Technologies). Eraldatud RNA proovid säilitati -80 °C juures.

Pärast RNA kontsentratsioonide mõõtmist viidi läbi DNAasi töötlus. Lõppmahuga 22 µl reaktsiooni kohta võeti 16 µl RNA lahust (8-16 µg RNAd), 2 µl puhvrit (10x DNase I Buffer,

Thermo Scientific) ja 2 µl DNAasi I (2 U) (DNase I, Thermo Scientific). Proove inkubeeriti 37 °C juures 30 min ning seejärel lisati 2 µl 50 mM EDTA (Thermo Scientific). Proovid segati vorteksil ja inkubeeriti DNAasi inaktiveerimiseks 10 min 65 °C juures. DNAasiga töödeldud RNA proovid säilitati -80 °C juures.

2.2.4. cDNA süntees

Eelnevalt saadud frontaalkoore RNAST sünteesiti komplementaarne DNA. cDNA sünteesil kasutati SuperScript™ III pöördtranskriptaasi (Invitrogen) ja heksameerseid oligonukleotiide vastavalt tootja juhendile. 20 µl lõpplahuse kohta võeti 1 µg DNAasi töötlust läbinud RNAd (lähtuti enne DNAasi töötlust mõõdetud RNA kontsentratsioonist), 2 µl (50 µg/ml) heksameerset praimerit (Applied Biosystems) ja 1 µl 10 mM dNTP segu (Fermentas). Heksameersete praimerite seundumisel inkubeeriti proove 5 min 65 °C juures. Järgnevalt tõsteti tuubid vähemalt 5 minutiks jääle. cDNA sünteesiks lisati proovidele 4 µl 5X reaktsioonipuhvrit [250 mM Tris-HCl (pH 8,3 toatemperatuuril), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 1 µl 0,1 M DTT ja 200 U SuperScript™ III pöördtranskriptaasi. Sünteesi toimumisel inkubeeriti proove 10 min 25 °C ja 60 min 50 °C juures. Seejärel peatati reaktsioon, hoides katsuteid 15 min 70 °C juures. Saadud cDNA proovid säilitati -80 °C juures.

2.2.5. Kvantitatiivne reaala PCR (qPCR)

Praimerid qPCRi reaktsiooniks selekteeriti Primer3Plus vabavaralise tarkvara vahendusel. *Egf* geeni *forward* praimer järjestusega 5'-TTTGCACAGACAGCCCTGAAG-3' ning *reverse* praimer järjestusega 5'-CAATCCAGTCCAGGGCAAGAC-3' lokeeruvad 11. eksonis. Ekspresseeruva amplikoni pikkus on 120 aluspaari ning see hõlmab NCBI referentsjärjestuste NM_010113 ja NM_001310737 transkripte. Praimerite sobivust kinnitati geelelektroforeesis nähtud amplikonide spetsiifilisuse alusel. Valitud praimerite efektiivsust kontrolliti qPCR reaktsioonis.

Referentsgeenina kasutati *Hprt* (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*), mille efektiivsus ja stabiilsus on eelnevalt tõestatud (Raud jt, 2009). *Hprt* geeni ekspresseerimiseks kasutati *forward* praimerit 5'-CACAGGACTAGAACACCTGC-3' ja *reverse* praimerit järjestusega 5'-GCTGGTGAAAAGGACCTCT-3'. Iga katsegrupi referentsgeeni ekspressioonitase määrati vastava grupi isendite cDNade segust. Transkriptide tase

kvantifitseeriti qPCR reaktsioonis. Kõik reaktsioonid sooritati eraldi nelja üksiku kordusena (*singleplex*). Ühel qPCR plaadil vaadeldi koos metsiktüüpi hiireliinide (BL6 ja SV129) erinevate töötlustega gruppide (kontroll, akuutne ja krooniline) *Egf* geeni ekspressiooni võrdluses referents *Hprt* geeniga.

Geeniekspressiooni läbiviimisel kasutati järgnevaid reagente: 5X PCR puhver (5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX), mis koosneb: HOT FIREPol® DNA Polymerase, 5x EvaGreen® qPCR buffer, 12.5 mM MgCl₂ 1x PCR solution – 2.5 mM, dNTPs, EvaGreen® dye, ROX dye). Kvantitatiivne PCR viidi läbi QuantStudio™ 12K Flex (Applied Biosystems, USA) ja QuantStudio™ 12K Flex Software 1.2.2 tarkvara vahendusel. Reaktsiooni maht oli 10 µl ja igast proovist villiti neli tehnilist kordust. 10 µl reaktsiooni kohta lisati 2 µl 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus, *forward* ja *reverse* praimereid 600 nM ja cDNAd 1ng/µl lahjenduseeni. Soovitud 1ng/µl cDNA kontsentratsiooni saamiseks vajalike lahjenduste arvutamisel lähtuti enne DNAasi töötlust mõõdetud RNAd kontsentratsioonidest. Andmed analüüsiti ja teisendati 2^{-ΔCT} kujule (Livak ja Schmittgen, 2001).

2.2.6. Andmete statistiline analüüs

Katset viidi läbi üks kord. Igas katsegrupis oli 8-12 isendit ning reaallaja-qPCRi analüüsis mõõdeti iga proovi ekspressioonitaset eraldi nelja üksiku kordusena.

Reaallaja-qPCRi andmete statistiline analüüs viidi läbi ühefaktorilise dispersioonanalüüsi (*one-way ANOVA*) ja liikumisaktiivsuse katse korduvmõõtmistega dispersioonanalüüsi (*repeated measures ANOVA*) abil Statistica 13 programmiga (Statsoft, USA). Mõlemal juhul kasutati Newman-Keulsi *post hoc* testi. Tulemused väljendati keskmiste väärtustena koos standardveaga (*standard error of mean*, SEM). Oluliseks loeti p-väärtus alla 0,05. Graafikud loodi GraphPad Prism 5 tarkvaraga (GraphPad Software Inc, USA).

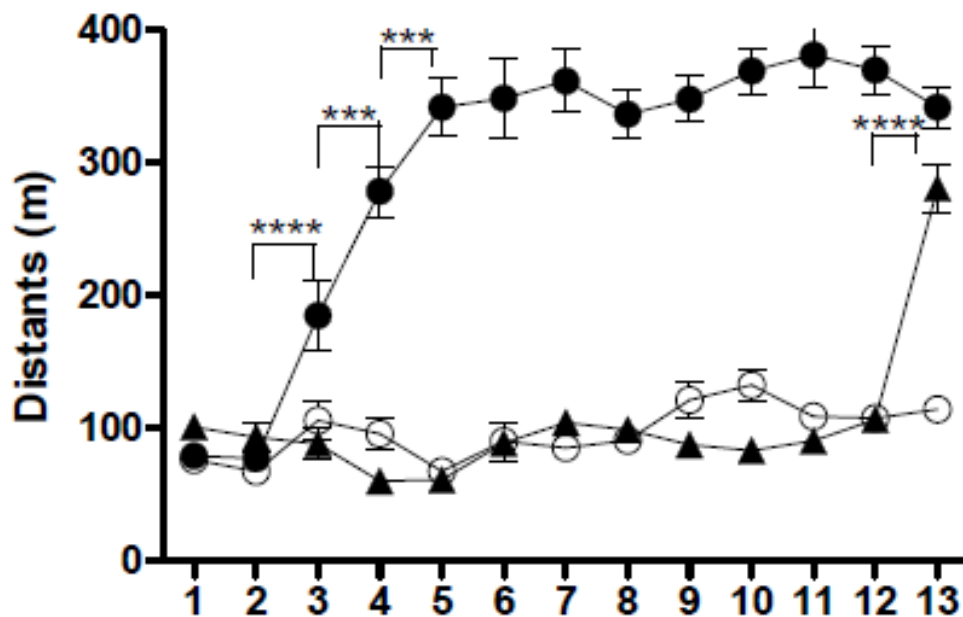
2.3. Tulemused

2.3.1. Liikumisaktiivsuse katse

Liikumisaktiivsuse katse läbiviimisel kasutati motoorse käitumusliku fenotüübi hindamisel metsiktüüpi laborihiire (*mus musculus*) liine 129S6SVEV/tu (SV129) ja C57bl6/N/tu (BL6). Katse käigus mõõdeti liikumisaktiivsust (läbitud distantid) ja püstumist. Selleks kasutati spetsiaalset arvutiga ühendatud fotoelektrilist jälgimissüsteemi. Liikumisaktiivsuse mõõtmisel asetati hiired poolläbipaistvatesse pleksiklaasist kastidesse, kus jälgimissüsteem registreeris läbitud distantide ja püstumiste arvu.

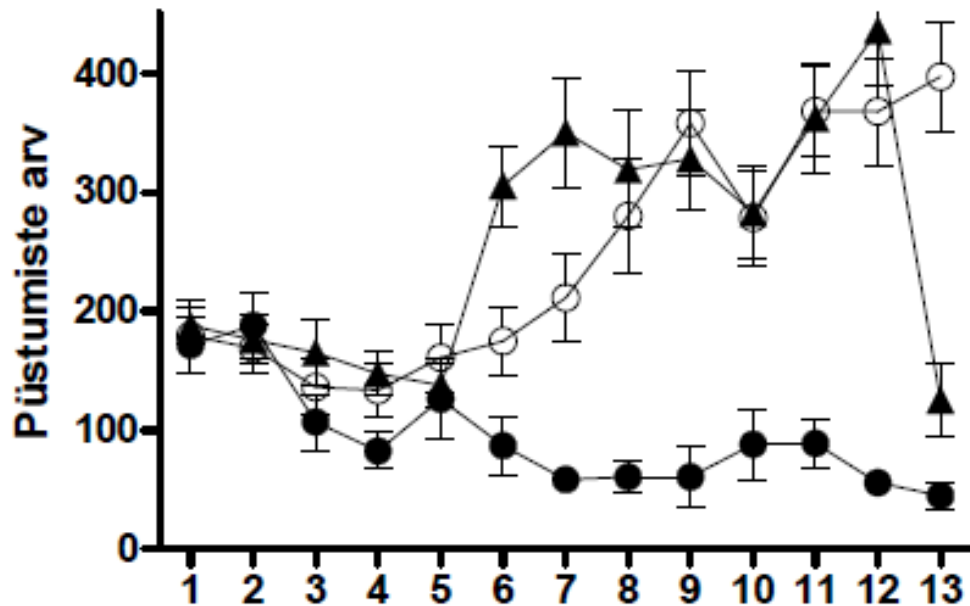
Liikumisaktiivsuse katses ilmnedid hiireliinide vahel ootuspärased käitumuslikud erinevused. Mõlema hiireliini gruppide tulemusi liikumisaktiivsuse ja püstumiste osas mõjutasid nii katsegrupp, katse päev kui ka katsegrupi ja päeva koosmõju. Alljärgnevalt on välja toodud hiireliinide täpsemad tulemused läbitud distantide ning püstumiste kohta.

Hiireliini BL6 isendite poolt läbitud distantide mõjutasid statistiliselt väga oluliselt nii katsegrupp ($F_{(2, 50)}=244,28$, $p=0,0000$), päev ($F_{(12, 600)}=55,73$, $p=0,0000$) kui ka katsegrupi ja päeva koosmõju ($F_{(24, 600)}=34,64$, $p=0,0000$). Füsioloogilist lahust saanud hiirte grupis liikumisaktiivsuses päevadevahelisi erinevusi *post hoc* testis ei ilmnunud (joonis 4). Amfetamiini kroonilise manustamise grupis pikendas esimene amfetamiini manustamine (3. päev) läbitud distantide 2. päevaga võrreldes statistiliselt oluliselt ($p=0,000016$). Teine manustamine (4. päev) pikendas läbitud distantide oluliselt 3. päevaga võrreldes ($p=0,0005$) ning kolmas manustamine (5. päev) 4. päevaga võrreldes ($p=0,00014$). Alates 4. manustamiskorrast (6. päev) liikumisaktiivsus enam oluliselt päevade lõikes ei suurenenud ning jäi kuni 13. päevani stabiilselt kõrgele tasemele. Akuutse manustamise grupis esimese 12 päeva liikumisaktiivsus päevade lõikes oluliselt ei varieerunud. 13. päeval suurendas manustatud amfetamiini annus läbitud distantide võrreldes 12. päevaga statistiliselt väga oluliselt ($p=0,00001$) (joonis 4).



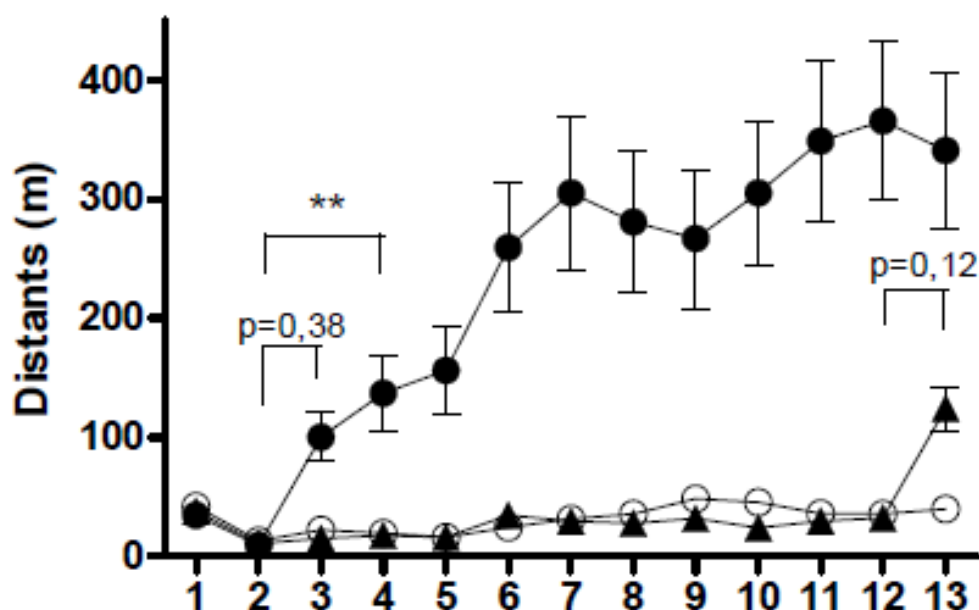
Joonis 4. Akuutse (mustad kolmnurgad, 13. päev) ja kroonilise (mustad ringid, 3.-13. päev) amfetamiini manustamise mõju BL6 hiirte liikumisaktiivsusele 1.-13. katsepäeval. Valged ringid: kontrollgrupp, kes sai 3.-13. päeval füsioloogilist lahust. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Püstumiste arv sõltus samuti väga oluliselt nii katsegrupist ($F_{(2, 50)}=16,29$, $p=0,0000$), päevast ($F_{(12, 600)}=10,76$, $p=0,0000$) kui ka katsegrupi ja päeva koosmõjust ($F_{(24, 600)}=11,02$, $p=0,0000$). *Post hoc* võrdlused näitasid, et füsioloogilist lahust saanud hiirte katsegrupis hakkas püstumiste arv suurenema 7.-8. päevast alates ning oli alates 9. päevast 1. päevaga võrreldes statistiliselt oluliselt suurem ($p < 0,01$) (joonis 5). Akuutse manustamise grupis oli püstumiste arvu graafik päevade lõikes sarnane füsioloogilist lahust saanud grupile, ent püstumiste arvu suurenemine algas järsult alates 6. päevast ning langes 13. päeval 12. päevaga võrreldes järsult ($p < 0,001$) amfetamiini esmakordse manustamise tulemusena. Kroonilise manustamise grupis oli esimesel kahel päeval, kui kõiki gruppe kohandati keskkonna tingimustega, püstumiste arv enam-vähem võrdne kahe ülejäänud katsegrupiga, ning amfetamiini manustamine surus selle alates 3. päevast kuni katse lõpuni (13. päevani) mõõdukalt alla (joonis 5).



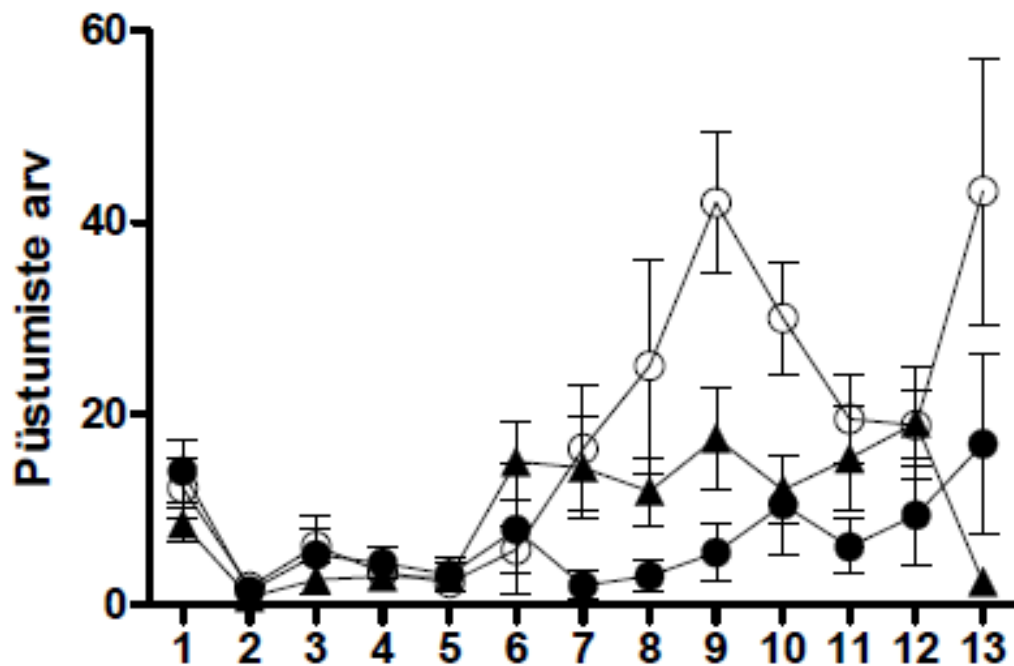
Joonis 5. Püstumiste arv liikumisaktiivsuse katses BL6 hiirte kontrollgrupis (valged ringid), amfetamiini akuutse manustamise grupis (mustad kolmnurgad) ja kroonilise manustamise grupis (mustad ringid) 1.-13. katsepäeval. Loetavuse huvides ei ole statistilisi erinevusi väljendavaid tärne joonisele lisatud, vastavad p-väärtused on esitatud tekstis.

Hiireliini SV129 isendite poolt läbitud distantse mõjutasid statistiliselt väga oluliselt nii katsegrupp ($F_{(2, 37)}=22,48$, $p=0,0000$), päev ($F_{(12, 444)}=14,61$, $p=0,0000$) kui ka katsegrupi ja päeva koosmõju ($F_{(24, 444)}=9,92$, $p=0,0000$). Liikumisaktiivsus ei tõusnud statistiliselt oluliselt ei kroonilise manustamise grupis 3. päeval võrreldes 2. päevaga ($p=0,38$) ega ka akuutse manustamise grupis 13. päeval võrreldes 12. päevaga ($p=0,12$). Kroonilise manustamise grupis suurenes liikumisaktiivsus 1. ja 2. päevaga võrreldes statistiliselt oluliselt alles 4. päeval ehk teise manustamise tulemusena. Füsioloogilist lahust saanud hiirte grupis oli liikumisaktiivsus kogu katse jooksul tugevalt alla surutud ja päevade vahel erinevusi ei ilmnenu (joonis 6). Võrreldes BL6 hiirtega oli näha *post hoc* (Newman-Keuls) võrdlustes amfetamiini akuutse (esmakordse) manustamise tunduvalt väiksem mõju SV129 liikumisaktiivsusele.



Joonis 6. Akuutse (mustad kolmnurgad, 13. päev) ja kroonilise (mustad ringid, 3.-13. päev) amfetamiini manustamise mõju SV129 hiirte liikumisaktiivsusele 1.-13. katsepäeval. Valged ringid: kontrollgrupp, kes sai 3.-13. päeval füsioloogilist lahust. ** $p < 0,01$.

Püstumiste arv sõltus samuti väga oluliselt nii katsegrupist ($F_{(2, 37)}=4,75$, $p=0,015$), päevast ($F_{(12, 444)}=7,87$, $p=0,0000$) kui ka katsegrupi ja päeva koosmõjust ($F_{(24, 444)}=3,71$, $p=0,0000$). Esimesel viiel päeval oli vertikaalne aktiivsus tugevalt alla surutud ning amfetamiini kroonilise manustamise grupis jäigi aine toimele allasurutuks. Füsioloogilise lahuse ja akuutse manustamise grupis hakkas vertikaalne aktiivsus alates 6. päevast mõõdukalt tõusma. Amfetamiini akuutne manustamine surus vertikaalse aktiivsuse 13. päeval võrreldes 12. päevaga alla ($p=0,006$) (joonis 7). Püstumiste arv oli SV129 hiirtel tervikuna palju väiksem kui BL6 hiirtel, kuid 13 päeva lõikes oli näha sarnast dünaamikat.

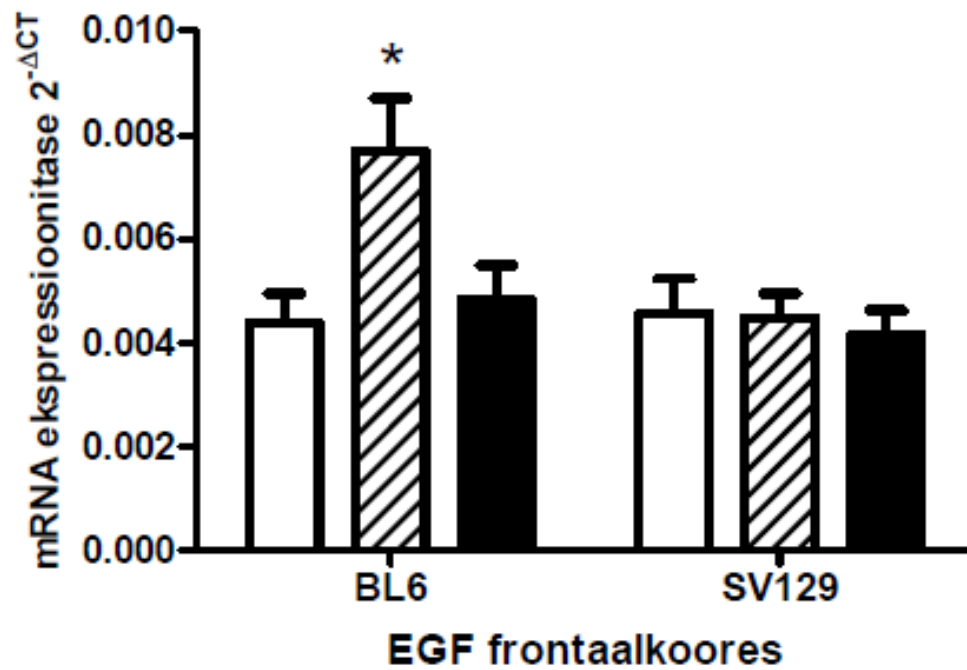


Joonis 7. Püstumiste arv (vertikaalne ehk uudistamisaktiivsus) liikumisaktiivsuse katses SV129 hiirte kontrollgrupis (valged ringid), amfetamiini akuutse manustamise grupis (mustad kolmnurgad) ja kroonilise manustamise grupis (mustad ringid) 1.-13. katsepäeval. Loetavuse huvides ei ole statistilisi erinevusi väljendavaid tärne joonisele lisatud, vastavad *post hoc* võrdlused on esitatud tekstis.

2.3.2. *Egf* geeni ekspressioonitaseme muutus

Eelnevalt läbi viidud liikumisaktiivsuse katse tulemuste (suurenenud läbitud distants ning madalam püstumiste arv) põhjal võib järeldada, et psühhoosi mudel töötas. 13. päeval eraldati katseloomade frontaalkoored ning mõõdeti *Egf* geeni ekspressioon. Hiireliini BL6 igas katsegrupis oli 11–12 looma ning SV129 hiireliini igas katsegrupis oli 8–10 looma.

Tulemused normaliseeriti referentsgeeni (*Hprt*) vastu ning on välja toodud $2^{-\Delta CT}$ kujul koos standardveaga joonisel 8. BL6 hiirte grupis mõjutas genotüüp *Egfi* ekspressioonitaset frontaalkoores statistiliselt oluliselt ($F_{(2,31)}=5,16$, $p=0,012$). *Post hoc* võrdlus (Newman-Keuls) näitas, et amfetamiini akuutsel manustamisel oli *Egfi* ekspressioonitase katse lõpus statistiliselt oluliselt kõrgem kui füsioloogilise lahuse manustamisel ($p=0,018$) ja amfetamiini kroonilisel manustamisel ($p=0,017$). SV129 hiirte grupis genotüüpide vahel erinevusi ei ilmnunud ($F_{(2,25)}=0,17$, $p=0,84$) (joonis 8).



Joonis 8. *Egf* geeni ekspressioonitase BL6 ja SV129 hiirtel katse lõpus vastusena amfetamiini akuutsele manustamisele 13. päeval (tribulised tulbad) ja kroonilisele manustamisele 3.-13. päeval (mustad tulbad). Valged tulbad: kontrollgrupp, kes sai kogu katse vältel (3.-13. päeval) füsioloogilist lahust. BL6: N=11–12 looma igas grupis; SV129: N=8–10 looma igas grupis. * $p < 0,05$.

2.4. Arutelu

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli psühhoosi mudeldamine läbi amfetamiini kroonilise manustamise kahes käitumuslikult väga erinevas hiireliinis (BL6 ja SV129) ning *Egf* geeni ekspressioonitasemete muutuste kirjeldamine nendes mudelites. Püstitatud eesmärkide saavutamiseks viidi läbi liikumisaktiivsuse katse 13 järjestikusel päeval ning mõõdeti seejärel qPCRi vahendusel *Egf* geeni ekspressiooni taset hiirte ajude frontaalkoortes. Amfetamiini kroonilise manustamise mõju hindamiseks lisati katsesse kontrollgrupi kõrvale katsegrupp, kes sai amfetamiini akuutselt (ainult viimasel päeval). Akuutse katsegrupi lisamise eesmärk oli luua võimalus ühekordse ja korduva manustamise mõju erinevuse hindamiseks.

Amfetamiini kroonilise manustamise annuse suuruse valikul lähtuti varasemalt samade hiireliinidega läbi viidud katsete tulemustest. Krooniliseks manustamiseks valitud annus (3 mg/kg) on akuutse doosina pigem “väike”, näiteks amfetamiini tundlikkuse doosikõvera katses kasutatakse sageli annuseid 2,5 mg/kg, 5 mg/kg ja 7,5 mg/kg (Innos jt, 2013). Valitud 3 mg/kg annus ei kutsu esimesel manustamispäeval esile maksimaalset liikumisaktiivsuse tõusu. Korduval manustamisel toimub aga sensitiseerumine aine suhtes ning liikumisaktiivsus hakkab päev-päevalt kasvama, saavutades mõne päeva pärast umbes sama taseme, mis akuutse suure (nt 7,5 mg/kg) annuse puhul (joonised 4 ja 6). Liikumisaktiivsuse (“horisontaalse” aktiivsuse) kõrval vaadeldi ka uudistamisaktiivsust (“vertikaalset” aktiivsust), mida väljendavad tagakäppadele tõusud ehk püstumised. Amfetamiin pärsib vertikaalset aktiivsust ning on seetõttu sobiv lisaparameeter aine mõju dünaamika hindamiseks ajas ja samuti hiireliinide käitumuslike erinevuste esile toomiseks (Heinla jt, 2014).

Amfetamiini krooniline manustamine kutsus mõlemas hiireliinis esile tüüpilise liikumisaktiivsuse tugeva tõusu, mis saavutas maksimumi (platoo) 3-4 päevaga. Akuutse manustamise mõju oli SV129 hiirtel oluliselt nõrgem kui BL6 hiirtel ning samuti olid SV129 hiired, nagu varasemate andmete (Abramov jt, 2008) põhjal eeldada võis, oluliselt väiksema üldise liikumis- ja uudistamisaktiivsusega. Kokkuvõttes võib öelda, et amfetamiini akuutne ja krooniline manustamine andis liikumisaktiivsuse ja püstumiste osas oodatud tulemuse. Samuti on SV129 ja BL6 hiireliinide käitumise osas ilmnenud erinevused kooskõlas varasemate andmetega (Abramov jt, 2008; Heinla jt, 2014).

Egf geeni ekspressioonitasemete kirjeldamisel ilmnes, et akuutselt amfetamiini saanud BL6 hiirte *Egf*i ekspressioonitase oli katse lõpus oluliselt kõrgem kui BL6 amfetamiini kroonilise manustamise grupis ja BL6 kontrollgrupis. Füsioloogilist lahust saanud kontrollgrupp ja krooniliselt amfetamiini saanud grupp omavahel ei erinenud. SV129 hiirte kolm katsegruppi

Egfi taseme poolest omavahel ei erinenud. Statistiliselt olulise erinevuse esinemine BL6 akuutse manustamise grupis võib olla seotud BL6 hiireliini tundlikkusega amfetamiini suhtes. BL6 kroonilise manustamise grupp saavutas amfetamiini indutseeritud liikumisaktiivsuse platoo viiendal päeval (joonis 4). Samas SV129 kroonilise manustamise grupp saavutas platoo seitsmendal päeval (joonis 6). See viitab aeglasemale sensitisatsiooni toimumisele SV129 hiireliinis. Üks võimalik hüpotees on, et *Egfi* ekspressiooni muutus võib esineda ainult olukorras, kus amfetamiini mõju on piisavalt tugev. Sellisel juhul peaks amfetamiini suurem doos põhjustama kiirema sensitisatsiooni. Kuna amfetamiini manustamise tagajärjel leiavad aset mitmed ajutegevuse kahjustused, on neid kahjustusi vaja kompenseerida. Kahjustuste korvamine võib toimuda näiteks suurenenud *Egfi* ekspressiooni toimetel. Kuid selline *Egfi* muutus sõltub hiireliinist ja amfetamiini doosist.

Et BL6 kroonilise manustamise grupis *Egf* geeni ekspressioon kontrollgrupiga võrreldes ei erinenud, võib see viidata võimalikule *Egf* geeni ekspressiooni mahasurumisele akuutse ülitundlikkusreaktsiooni järel. Kuna SV129 hiirtel sellist ülitundlikkust ei esinenud, võiks neid kahte hiireliini vaadelda populatsiooni tasandil mimikeeriva mudelina. Selles mudelis tähistaks SV129 tavapopulatsiooni, mis on psühhoosi suhtes resistentsem ja BL6 tähistaks psühhoosi suhtes vastuvõtlikku isendite gruppi. Juhul, kui *Egfi* ekspressioonitase muutub vastuvõtlike isendite grupis, on põhjust eeldada psühhoosilaadsete protsesside toimumist, kus on vaja kompenseerida aset leidvaid kahjustusi. Eeldusel, et amfetamiini manustamine mimikeerib psühhoosilaadset seisundit, võib öelda, et kõrgenenud *Egfi* ekspressiooni korral on tegemist pigem “esmise psühhoosi varase faasi” markeriga ja esmise psühhoosi hilisemas faasis (nt nädal kestnud psühhoos) võib *Egfi* ekspressioon olla juba langenud.

Ühe täiendava hüpoteesina võib välja tuua, et akuutse manustamise järel muutub ka EGF valgu tase. Kuigi antud töö ei kajastanud kuivõrd *Egf* geeni ekspressioon ja valguekspressioon kattuvad, võib nende korreleerumine seletada, miks hiljem ekspressioon langeb. Nimelt võib EGF ligandi jõudmine rakumembraani pinnale olla valgu tasandil enne akuutset faasi limiteeritud, kuid akuutse faasi järel enam mitte.

Käesolev magistritöö, kus vaadeldi amfetamiini akuutse ja kroonilise manustamise järel *Egfi* taset frontaalkoores, moodustab ainult ühe väikese osa käimasolevast suuremast Psühhiaatriakliiniku projektist, mille eesmärk on hinnata *Egfi* ja mitmete teiste markerite muutusi erinevates ajuosades amfetamiinist tingitud psühhoosi mudelis. Seetõttu ei saa eelnevast teha kaugeleulatuvaid järeldusi, kuid töös leitud *Egfi* muutused frontaalkoores kinnitavad kaudselt hiljuti (Haring jt, 2015) leitud võimalikke seoseid *Egfi* ja skisofreenia kujunemise vahel.

KOKKUVÕTE

Leiud viitavad, et akuutse ja kroonilise skisofreenia patsientidel esineb ebanormaalne EGF-i produktsioon. EGF-i taseme kõikumine võib olla esmaste psühhooosi ilmingute avaldumise molekulaarne marker. Ka mitmed geenimanipulatsiooni uuringud viitavad sellele, et EGF perekonna kahjustunud signalisatsioon võib olla seotud erinevate ajuhaigustega.

Käesolevas töös mudeldati psühhooosi kahes erinevas hiireliinis (BL6 ja SV129) kroonilise amfetamiini manustamise abil ning kirjeldati seejärgseid *Egf* geeni ekspressioonitaseme muutusi. Amfetamiini kroonilise manustamise mõjul muutusid BL6 ning SV129 kroonilise ja akuutse grupi nii vertikaalne kui ka horisontaalne liikumisaktiivsus oodatud suunas, mistõttu võib psühhooosilaadse seisundi mudeldamise lugeda õnnestunuks.

BL6 hiireliini kroonilise ja akuutse manustamise grupid liikusid rohkem kui SV129 kroonilise ja akuutse manustamise grupp. BL6 kroonilise manustamise grupi hiired saavutasid kiiremini motoorse aktiivsuse platoo. BL6 suurem tundlikus amfetamiini suhtes on arvatavasti tingitud liiniomastest genotüübist.

Egf geeni ekspressioon määrati kõigis katsegruppides. Statistiliselt oluline erinevus ilmnes BL6 hiire akuutse amfetamiini manustamise grupi ja kontrollgrupi vahel. BL6 akuutse amfetamiini grupis esines ekspressioonitaseme tõus, mida teiste gruppide korral ei täheldatud.

Töö tulemusel selgus amfetamiini 3 mg/kg doosi sobilikkus psühhooosilaadse käitumise esile kutsumiseks BL6 hiireliinis. Ühtlasi selgus, et amfetamiin indutseerib *Egf* geeni ekspressiooni. Edasistes uuringutes saab kasutada kroonilist ja akuutset amfetamiini manustamist EGF perekonna ligandide ekspressiooni uurimiseks.

***Egf* gene expression in the model of amphetamine induced psychosis**

Acute and chronic schizophrenic patients have abnormal production of EGF. EGF ligands interact with ErbB receptor tyrosine kinases influencing brain development and function. Abnormalities in ErbB and EGF expression may manifest before the onset of psychosis. EGF may therefore be a molecular marker for early onset of schizophrenia. Also a number of genetic manipulation studies have suggested that the EGF family may be related to various diseases of the brain.

In this work psychosis was modelled in two different mouse strains (BL6 and SV129) by chronic amphetamine administration. Behavioural manifestations were in line with the model of amphetamine induced psychosis. Acute and chronic administration of amphetamine changed the vertical and horizontal activity of mice. BL6 chronic and acute administration groups were more affected than SV129 chronic and acute administration groups. In chronic administration group, BL6 mice reached the motor activity plateau faster. This indicates that BL6 is more sensitive to amphetamine induced manipulations. Higher sensitivity of BL6 mice to amphetamine is probably due to genotype and must be taken into account in further studies.

EGF gene expression was also determined in all experimental groups. There was a statistically significant up-regulation of *Egf* in BL6 acute amphetamine administration group. BL6 acute amphetamine group showed an increase in the expression of *Egf* and higher locomotor activity after amphetamine injection. Though chronic administration of BL6 showed no statistically significant change, expression could have peaked after first injection and normalized soon after, indicating complex regulatory control of *Egf* expression.

This work revealed the suitability of a low (3 mg/kg) dose of amphetamine for eliciting psychotic-like behaviour in BL6 mouse strain. It also revealed the presence of amphetamine-induced effect on *Egf* gene expression. In subsequent studies BL6 chronic and acute administration of amphetamine can be used to study the expression of the ligands of EGF family.

A) Ajakiri

Abe, Y., Namba, H., Zheng, Y. ja Nawa, H., (2009a). In situ hybridization reveals developmental regulation of ErbB1-4 mRNA expression in mouse midbrain: implication of ErbB receptors for dopaminergic neurons. *Neuroscience*; 161:95–110.

Abi-Dargham, A., Gil, R., Krystal, J., Baldwin, R.M., Seibyl, J.P., Bowers, M. jt, (1998). Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort. *Am J Psychiatry*; 155(6):761-7.

Abi-Dargham, A., Rodenhiser, J., Printz, D., Zea-Ponce, Y., Gil, R., Kegeles, L.S. jt, (2000). Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97(14):8104-9.

Abramov, U., Puusaar, T., Raud, S., Kurrikoff, K. ja Vasar, E., (2008). Behavioural differences between C57BL/6 and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment. *Neuroscience Letters*; 443:223–227

Aguirre, A., Rizvi, T.A., Ratner, N. ja Gallo, V., (2005). Overexpression of the epidermal growth factor receptor confers migratory properties to nonmigratory postnatal neural progenitors. *J. Neurosci.*; 25:11092–11106.

Aguirre, A., Rubio, M.E. ja Gallo, V., (2010). Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature*; 467:323–327.

Andreasen, N.C., (1995). Symptoms, signs, and diagnosis of schizophrenia. *Lancet*; 346:477-81.

Angrist, B.M., Gershon, S., (1970). The phenomenology of experimentally induced amphetamine psychosis – preliminary observations. *Biol Psychiatry*; 2(2):95-107.

Aston, C., Jiang, L., ja Sokolov, B.P., (2004). Microarray analysis of post mortem temporal cortex from patients with schizophrenia. *J. Neurosci.Res*; 77,858–866.

Baldessarini, R.J. ja Tarazi, F.I., (1996). Brain dopamine receptors: a primer on their current status, basic and clinical. *Harv Rev Psychiatry*; 3(6):301-25.

Breier, A., Su, T.P., Saunders, R., Carson, R.E., Kolachana, B.S., de Bartolomeis, A. Jt, (1997). Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 94(6):2569-74.

Carlsson, A. (1988). The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*; 1:179–186.

- Costall, B.L. ja Naylor R.J., (1995). Behavioural interactions between 5-hydroxytryptophan, neuroleptic agents and 5-HT receptor antagonists in modifying rodent responding to aversive situations. *Br J Pharmacol.*; 116(7):2989-99.
- Creese, I., Burt, D.R. ja Snyder, S.H., (1976). Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science*; 192:481-3.
- Das, P.M., Thor, A.D., Edgerton, S.M., Barry, S.K., Chen, D.F., ja Jones, F.E., (2010). Reactivation of epi- genetically silenced HER4/ERBB4 results in apoptosis of breast tumor cells. *Oncogene*; 29, 5214–5219.
- Davis, K.L., Kahn, R.S., Ko, G. ja Davidson, M., (1991). Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry*; 148(11):1474-86.
- Davis, K.L., Stewart, D.G., Friedman, J.I., Buchsbaum, M., Harvey, P.D., Hof, P.R. jt, (2003). White matter changes in schizophrenia: evidence for myelin-related dysfunction. *Arch.Gen.Psychiatry*; 60:443–456.
- Den Boer, J.A., van Megen, H.J., Fleischhacker, W.W., Louwerens, J.W., Slaap, B.R., Westenberg, H.G. jt, (1995). Differential effects of the D1 DA receptor antagonist SCH39166 on positive and negative symptoms of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*; 121(3):317-22.
- Derynck, R., Roberts, A.B., Winkler, M. E., Chen, E.Y. ja Goeddel, D.V., (1984). Human transforming growth factor-alpha: precursor structure and expression in E. coli. *Cell*; 38:287–297.
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., jt, (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*; 307:521–527.
- Featherstone, R.E., Kapur, S. ja Fletcher, P.J. (2007a). The amphetamine-induced sensitized state as a model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 31:1556–1571.
- Featherstone, R.E., Rizos, Z., Kapur, S. ja Fletcher, P.J. (2008). A sensitizing regimen of amphetamine that disrupts attentional set-shifting does not disrupt working or long-term memory. *Behav Brain Res*; 189:170–179.
- Ferrari, G., Toffano, G. ja Skaper, S.D., (1991). Epidermal growth factor exerts neuronotrophic effects on dopaminergic and GABAergic CNS neurons: comparison with basic fibroblast growth factor. *J Neurosci Res*; 30: 493–497.
- Flynn, S.W., Lang, D.J., Mackay, A.L., Goghari, V., Vavasour, I.M., Whittall, K.P. jt, (2003). Abnormalities of myelination in schizophrenia detected *in vivo* with MRI, and post-mortem with analysis of oligodendrocyte proteins. *Mol. Psychiatry*; 8:811–820.

- Futamura, T., Kakita, A., Tohmi, M., Sotoyama, H., Takahashi, H. ja Nawa, H., (2003). Neonatal perturbation of neurotrophic signaling results in abnormal sensorimotor gating and social interaction in adults: implication for epidermal growth factor in cognitive development. *Molecular Psychiatry*; 8:19–29.
- Futamura, T., Toyooka, K., Iritani, S. jt, (2002). Abnormal expression of epidermal growth factor and its receptor in the forebrain and serum of schizophrenic patients. *Molecular Psychiatry*; 7(7):673–682.
- Garratt, A.N., Ozcelik, C. ja Birchmeier, C., (2003). ErbB2 pathways in heart and neural diseases. *Trends Cardiovasc Med*; 13:80–86.
- Gil, C., Najib, A. ja Aguilera, J., (2003). Serotonin transport is modulated differently by tetanus toxin and growth factors. *Neurochem Int*; 42:535–542.
- Gold, J.M., Hermann, B.P., Randolph, C., Wyler, A.R., Goldberg, T.E. ja Weinberger, D.R., (1994). Schizophrenia and temporal lobe epilepsy. A neuropsychological analysis. *Arch Gen Psychiatry*; 51(4):265-72.
- Gordon, A.J., (2010). Testing the glutamate hypothesis of schizophrenia. *Nature Neuroscience*; 13,2-4.
- Grace, A.A., (2000). Gating of information flow within the limbic system and the pathophysiology of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev*; 31(2-3):330-41.
- Gurevich, E.V., Bordelon, Y., Shapiro, R.M., Arnold, S.E., Gur, R.E. ja Joyce, J.N., (1997). Mesolimbic dopamine D3 receptors and use of antipsychotics in patients with schizophrenia. A postmortem study. *Arch Gen Psychiatry*; 54(3):225-32.
- Haring, L., Koido, K., Vasar, V., Leping, V., Zilmer, K., Zilmer, M. ja Vasar, E., (2015). Antipsychotic treatment reduces psychotic symptoms and markers of low-grade inflammation in first episode psychosis patients, but increases their body mass index. *Schizophrenia Research*; 169:22–29.
- Hartman, D.S. ja Civelli, O., (1997). Dopamine receptor diversity: molecular and pharmacological perspectives. *Prog Drug Res*; 48:173-94.
- Heinla, I., Leidmaa, E., Visnapuu, T., Philips, M.A., Vasar, E., (2014). Enrichment and individual housing reinforce the differences in aggressiveness and amphetamine response in 129S6/SvEv and C57BL/6 strains. *Behav Brain Res.*; 267:66-73
- Higashiyama, S. ja Nanba, D., (2005). ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1751(1):110–117.
- Higashiyama, S., Abraham, J.A., Miller, J., Fiddes, J.C. ja Klagsbrun, M., (1991). A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science*; 251:936–939.

- Higashiyama, S., Horikawa, M., Yamada, K., Ichino, N., Nakano, N., Nakagawa, T. jt, (1997). A novel brain-derived member of the epidermal growth factor family that interacts with ErbB3 and ErbB4. *J. Biochem.*; 122:675–680.
- Hobbs, S.S., Coffing, S.L., Le, A. T., Cameron, E.M., Williams, E. E., Andrew, M. Jt, (2002). Neuregulin isoforms exhibit distinct patterns of ErbB family receptor activation. *Oncogene*; 21:8442–8452.
- Holmes, W.E., Sliwkowski, M.X., Akita, R.W., Henzel, W.J., Lee, J., Park, J.W. jt, (1992). Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science*; 256:1205–1210.
- Howes, O.D. ja Kapur, S., (2009). The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophr Bull*; 35(3):549-62.
- Howes, O.D., Kambeitz, J., Kim, E. jt, (2012). The Nature of Dopamine Dysfunction in Schizophrenia and What This Means for Treatment: Meta-analysis of Imaging Studies. *Arch Gen Psychiatry*; 69(8):776-86.
- Howes, O.D., Williams, M., Ibrahim, K. jt, (2013). Midbrain dopamine function in schizophrenia and depression: a post-mortem and positron emission tomographic imaging study. *Brain*; 136(11):3242-51.
- Innos, J., Leidmaa, E., Philips, M.A., Sütt, S., Alttoa, A., Harro, J., Kõks, S., Vasar, E., (2013). *Lsmp^{-/-}* mice display lower sensitivity to amphetamine and have elevated 5-HT turnover. *Biochem Biophys Res Commun.*; 430(1):413-8.
- Insel, R.T., (2010). Rethinking schizophrenia. *Nature*; 468:187-193.
- Iwakura, Y. ja Nawa, H. (2013). ErbB1-4-dependent EGF/neuregulin signals and their crosstalk in the central nervous system: pathological implications in schizophrenia and Parkinson's disease. *Front. Cell. Neurosci.*; 7:4.
- Iwakura, Y., Piao, Y.S., Mizuno, M., Takei, N., Kakita, A., Takahashi, H. jt, (2005). Influences of dopaminergic lesion on epidermal growth factor-ErbB signals in Parkinson's disease and its model: neurotrophic implication in nigro-striatal neurons. *J. Neurochem.*; 93:974–983.
- Iwakura, Y., Zheng, Y., Sibilio, M., Abe, Y., Piao, Y.S., Yokomaku, D. Jt, (2011). Qualitative and quantitative re-evaluation of epidermal growth factor-ErbB1 action on developing midbrain dopaminergic neurons in vivo and in vitro: target-derived neurotrophic signaling (Part1). *J. Neurochem.*; 118:45–56.
- Jones, C., Watson, D. ja Fone, K. (2011). Animal models of schizophrenia. *British Journal of Pharmacology*; 164:1162–1194.
- Joyce, J.N. ja Meador-Woodruff, J.H., (1997). Linking the family of D2 receptors to neuronal circuits in human brain: insights into schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*; 16(6):375-84.

- Kawaguchi, Y. ja Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex*; 7:476–486.
- Kebabian, J.W. ja Calne, D.B., (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature*; 277:93-6.
- Kinugasa, Y., Ishiguro, H., Tokita, Y., Oohira, A., Ohmoto, H. ja Higashiyama, S., (2004). Neuroglycan, C, a novel member of the neuregulin family. *Biochem.Biophys.Res.Communic.*; 321:1045–1049.
- Kokkinidis, L. ja Anisman, H., (1980). Amphetamine models of paranoid schizophrenia: an overview and elaboration of animal experimentation. *Psychol Bull*; 88(3):551-79.
- Kramer, A., Yang, F.C., Snodgrass, P., Li, X., Scammell, T.E., Davis, F.C. jt, (2001). Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science*; 294, 2511–2515.
- Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C., ja Aaronson, S.A., (1989). Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 86:9193–9197.
- Lachowicz, J.E. ja Sibley, D.R., (1997). Molecular characteristics of mammalian dopamine receptors. *Pharmacol Toxicol*; 81(3):105-13.
- Laruelle, M. (1998). Imaging dopamine transmission in schizophrenia. A review and meta-analysis. *Q J Nucl Med*; 42(3):211-21.
- Lewis, D. A. ja Lieberman, J. A. (2000). Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron*; 28:325–334.
- Lewis, D.A., Hashimoto, T. ja Volk, D.W. (2005). Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*; 6:312-324.
- Levy, D.L., Smith, M., Robinson, D., Jody, D., Lerner, G., Alvir, J. Jt, (1993). Methylphenidate increases thought disorder in recent onset schizophrenics, but not in normal controls. *Biol Psychiatry*; 34(8):507-14.
- Lieberman, J.A., Alvir, J., Geisler, S., Ramos-Lorenzi, J., Woerner, M., Novacenko, H. Jt, (1994). Methylphenidate response, psychopathology and tardive dyskinesia as predictors of relapse in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*; 11(2):107-18.
- Lieberman, J.A., Kane, J.M. ja Alvir, J. (1987). Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*; 91(4):415-33.
- Lipska, B.K. ja Weinberger, D.R., (2000). To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*.; 23(3):223-39.
- Livak, K.J. ja Schmittgen, T.D., (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*.;25(4):402-8.

- Marchotte, E.R., Pearson, D.M., Srivastava, L.K. (2001). Animal models of schizophrenia: a critical review. *J Psychiatry Neurosci*; 26(5):395-410.
- Martinez, V. ja Sarter, M. (2008). Detection of the moderately beneficial cognitive effects of low-dose treatment with haloperidol or clozapine in an animal model of the attentional impairments of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*; 33:2635–2647.
- Meng, Z.H., Feldpaush, D.L. ja Merchant, K.M. (1998). Clozapine and haloperidol block the induction of behavioral sensitization to amphetamine and associated genomic responses in rats. *Brain Res Mol Brain Res*; 61:39–50.
- Mirsky, A.F., (1988). Research on schizophrenia in the NIMH Laboratory of Psychology and Psychopathology, 1954–1987. *Schizophr Bull*; 14(2):151-6.
- Mizuno, M., Kawamura, H., Takei, N., ja Nawa, H., (2008). The anthraquinone derivative Emodin ameliorates neurobehavioral deficits of a rodent model for schizophrenia. *J.Neural.Transm.*; 115:521–530.
- Mizuno, M., Malta, R.S. Jr, Nagano, T. ja Nawa, H., (2004). “Conditioned place preference and locomotor sensitization after repeated administration of cocaine or methamphetamine in rats treated with epidermal growth factor during the neonatal period,” *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1025:612–618.
- Moghal, N. ja Sternberg, P.W., (1999). Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr.Opin.CellBiol*; 11:190–196.
- Morland, J., (2000). Toxicity of drug abuse – amphetamine designer drugs (ecstasy): mental effects and consequences of single dose use. *Toxicol Lett*; 112-113:147-52.
- Murray, R.M., Lappin, J. ja Di Forti, M. (2008). Schizophrenia: from developmental deviance to dopamine dysregulation. *Eur Neuropsychopharmacol*; 18:S129–S134.
- Nagano, T., Namba, H., Abe, Y., Aoki, H., Takei, N. ja Nawa, H., (2007). *In vivo* administration of epidermal growth factor and its homologue attenuates developmental maturation of functional excitatory synapses in cortical GABAergic neurons. *Eur.J.Neurosci.*; 25:380–390.
- Nakagawa, T., Sasahara, M., Hayase, Y., Haneda, M., Yasuda, H., Kikkawa, R. jt (1998). Neuronal and glial expression of heparin-binding EGF-like growth factor in central nervous system of prenatal and early-postnatal rat. *Dev Brain Res*; 108:263–272.
- Namba, H., Nagano, T., Iwakura, Y., Xiong, H., Jourdi, H., Takei, N. jt, (2006). Transforming growth factor alpha attenuates the functional expression of AMPA receptors in cortical GABAergic neurons. *Mol.Cell.Neurosci.*; 31:628–641.
- Nawa, H., Sotoyama, H., Iwakura, Y., Takei, N. ja Namba, H., (2014). Neuropathologic Implication of Peripheral Neuregulin-1 and EGF Signals in Dopaminergic Dysfunction and Behavioral Deficits Relevant to Schizophrenia: Their Target Cells and Time Window. *BioMed Research International*; 2014:12 pages.

- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., ja Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.*; 19:3159–3167.
- Pijnenburg, A.J., Honig, W.M. ja Van Rossum, J.M., (1975). Inhibition of amphetamine-induced locomotor activity by injection of haloperidol into the nucleus accumbens of the rat. *Psychopharmacologia*; 41(2):87-95.
- Pitfield, S.E., Bryant, I., Penington, D.J., Park, G. ja Riese, D.J. teine, (2006). Phosphorylation of ErbB4 on tyrosine 1056 is critical for ErbB4 coupling to inhibition of colony formation by human mammary cell lines. *Oncol.Res.*; 16:179–193.
- Plata-Salaman, C.R., (1991). Epidermal growth factor and the nervous system. *Peptides*; 12:653–663.
- Plowman, G.D., Culouscou, J.M., Whitney, G.S., Green, J.M., Carlton, G.W., Foy, L. Jt, (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 90:1746–1750.
- Raud, S., Sütt, S., Luuk, H., Plaas, M., Innos, J., Kõks, S. ja Vasar, E., (2009). Relation between increased anxiety and reduced expression of alpha1 and alpha2 subunits of GABA(A) receptors in Wfs1-deficient mice. *Neurosci Lett*; 460(2):138-42.
- Ring, H.Z., Chang, H., Guilbot, A., Brice, A., LeGuern, E. ja Francke, U., (1999). The human neuregulin-2 (NRG2) gene: cloning, mapping and evaluation as a candidate for the autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease linked to 5q. *Hum Genet.*; 104(4):326-32.
- Robinson, T.E. ja Becker, J.B., (1986). Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res*; 396(2):157-98.
- Robinson, T.E. ja Kolb, B. (1999). Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci*; 11:1598–1604.
- Russig, H., Durrer, A., Yee, B.K., Murphy, C.A. ja Feldon, J. (2003). The acquisition, retention and reversal of spatial learning in the Morris water maze task following withdrawal from an escalating dosage schedule of amphetamine in Wistar rats. *Neuroscience*; 119:167–179.
- Sarter, M., Martinez, V. ja Kozak, R. (2009). A neurocognitive animal model dissociating between acute illness and remission periods of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*; 202:237–258.
- Sasada, R., Ono, Y., Taniyama, Y., Shing, Y., Folkman, J. ja Igarashi, K., (1993). Cloning and expression of cDNA encoding human betacellulin, a new member of the EGF family. *Biochem.Biophys.Res. Commun.*; 190:1173–1179.

- Schechter, A.L., Stern, D.F., Vaidyanathan, L., Decker, S.J., Drebin, J.A., Greene, M.I. jt, (1984). The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*; 312:513–516.
- Seeman, P. ja Kapur, S., (2000). Schizophrenia: more dopamine, more D2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97(14):7673-5.
- Seeman, P., Corbett, R. ja Van Tol, H.H., (1997). Atypical neuroleptics have low affinity for dopamine D2 receptors or are selective for D4 receptors. *Neuropsychopharmacology*; 16(2):93-110.
- Seeman, P., Lee, T., Chau-Wong, M. ja Wong, K., (1976). Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature*; 261:717-9.
- Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K., ja Yamamoto, T., (1985). A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 82:6497–6501.
- Seroogy, K.B., Lundgren, K.H., Lee, D.C., Guthrie, K.M. ja Gall, C.M., (1993). Cellular localization of transforming growth factor- α mRNA in rat forebrain. *J Neurochem*; 60:1777–1782.
- Sharp, T., Zetterstrom, T., Ljungberg, T. ja Ungerstedt, U., (1987). A direct comparison of amphetamine-induced behaviours and regional brain dopamine release in the rat using intracerebral dialysis. *Brain Res*; 401(2):322-30.
- Shing, Y., Christofori, G., Hanahan, D., Ono, Y., Sasada, R., Igarashi, K. Jt, (1993). Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science*; 259:1604–1607.
- Shoyab, M., McDonald, V.L., Bradley, J.G. ja Todaro, G.J., (1988). Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 85(17):6528–6532.
- Shoyab, M., Plowman, G.D., McDonald, V.L., Bradley, J.G. ja Todaro, G.J., (1989). Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science*; 243:1074–1076.
- Snodgrass-Belt, P., Gilbert, J.L. ja Davis, F.C., (2005). Central administration of transforming growth factor- α and neuregulin-1 suppress active behaviors and cause weight loss in hamsters. *Brain Res.*; 1038:171–182.
- Sotoyama, H., Namba, H., Takei, N. ja Nawa, H., (2007). Neonatal exposure to epidermal growth factor induces dopamine D 2-like receptor supersensitivity in adult sensorimotor gating. *Psychopharmacology*; 191(3):783–792.

- Sotoyama, H., Zheng, Y., Iwakura, Y., Mizuno, M., Aizawa, M., Shcherbakova, K. Jt, (2011). Pallidal hyperdopaminergic innervation underlying D2 receptor-dependent behavioral deficits in the schizophrenia animal model established by EGF. *PLoS ONE*; 6:e25831.
- Stefansson, H., Sarginson, J., Kong, A., Yates, P., Steinthorsdottir, V., Gudfinnsson, E. Jt, (2003). Association of neuregulin 1 with schizophrenia confirmed in a Scottish population. *Am J Hum Genet*; 72:83–87.
- Stefansson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V. jt, (2002). Neuregulin 1 and Susceptibility to Schizophrenia. *The American Journal of Human Genetics*; 71(4):877–892.
- Stewart, D.G. ja Davis, K.L., (2004). Possible contributions of myelin and oligodendrocyte dysfunction to schizophrenia. *Int.Rev.Neurobiol.*; 59, 381–424.
- Strachan, L., Murison, J.G., Prestidge, R.L., Sleeman, M.A., Watson, J.D. ja Kumble, K.D., (2001). Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily. *J. Biol. Chem.*; 276:18265–18271.
- Sweeney, C., Fambrough, D., Huard, C., Diamonti, A.J., Lander, E.S., Cantley, L.C. jt, (2001). Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors. *J Biol Chem*; 276:22685–22698.
- Zakzanis, K.K. ja Hansen, K.T., (1998). Dopamine D2 densities and the schizophrenic brain. *Schizophr Res*; 32(3):201–6.
- Zhang, D., Sliwkowski, M.X., Mark, M, Frantz, G., Akita, R., Sun, Y., Hillan, K., Crowley, C., Brush, J. ja Godowski, P.J., (1997). Neuregulin-3 (NRG3): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 94:9562–9567.
- Tohmi, M., Tsuda, N., Mizuno, M., Takei, N., Frankland, P.W. ja Nawa, H., (2005). Distinct influences of neonatal epidermal growth factor challenge on adult neurobehavioral traits in four mouse strains. *Behavior Genetics*; 35(5):615–629.
- Toyoda, H., Komurasaki, T., Uchida, D., Takayama, Y., Isobe, T., Okuyama, T. Jt, (1995). Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *J. Biol.Chem.*; 270:7495–7500.
- Uchida, T., Wada, K., Akamatsu, T., Yonezawa, M., Noguchi, H., Mizoguchi, A. Jt, (1999). A novel epidermal growth factor-like molecule containing two follistatin modules stimulates tyrosine phosphorylation of erbB-4 in MKN28 gastric cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*; 266:593–602.
- van Os, J., Kenis, G. ja Rutten, B.P.F., (2010). The environment and schizophrenia. *Nature*; 468:203–212.

Watanabe, E., Maeda, N., Matsui, F., Kushima, Y., Noda, M. ja Oohira, A., (1995). Neuroglycan C, a novel membrane-spanning chondroitin sulfate proteoglycan that is restricted to the brain. *J. Biol. Chem.*; 270:26876–26882.

Werner, M.H., Nanney, L.B., Stoscheck, C.M. ja King, L.E., (1988). Localization of immunoreactive epidermal growth factor receptors in human nervous system. *J Histochem Cytochem*; 36:81–86.

Wong, D.F., Wagner, H.N. Jr, Tune, L.E., Dannals, R.F., Pearlson, G.D., Links, J.M. jt, (1986). Positron emission tomography reveals elevated D2 dopamine receptors in drug-naive schizophrenics. *Science*; 234:1558-63.

B) Raamat

Franklin, K. ja Paxinos, G., (1997). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego, Academic Press.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Ants Tamme (sünnikuupäev: 18. 05.1988)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Egf geeni ekspressioon amfetamiini manustamisel indutseeritud psühhoosi mudelis,

mille juhendajad on :

PhD Jürgen Innos

MSc Taavi Vanaveski

MSc Jane Narvik,

Kaasjuhendaja: PhD Tiina Tamm

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise alates 08.06.2020 eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 08.06.2020 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi

Tartu, 13.08.2016